

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**Biología Estructural de la Maquinaria de Remodelado y
Degradación de la Pared Bacteriana:
Mecanismos de activación de la
amidasa AmpD y el enzibiótico GP61**

Memoria que presenta el Licenciado en Biología César Andrés
Carrasco López para optar al grado de Doctor por la Universidad
Autónoma de Madrid

Director de Tesis: Dr. Juan Antonio Hermoso Domínguez

Instituto de Química-Física "Rocasolano"
Departamento de Cristalografía y Biología Estructural

Para Alzoray

Por hacer menos arriesgada esta aventura; tú eres mi hogar

y

a mi Abuela

que no la leerá...

Y aunque trabajo en cosas que no entiende, me apoya incondicionalmente

AGRADECIMIENTOS

La lista de agradecimientos es larga y podría excusarme en que no tengo palabras, pero mentiría... ¡la realidad es que las tengo!. El inconveniente reside en que, incluso expresándome con el mayor de los esmeros, me será imposible plasmar el cúmulo de consecuencias hormonales que revolotean mi cerebro.

A mi familia, incluida la familia política, especialmente a mi madre, mi abuela, mis hermanas, y a Henry, mi otro papá, por su apoyo incondicional, porque aunque no tenga un empleo fijo siguen estando orgullosos de mí (o al menos eso me dicen). Su apoyo recorre más de 9000 kilómetros cuando lo necesito.

A continuación quiero agradecer a tres Juanes, pilares de mi aprendizaje...

A mi amigo y también tutor Juan Hermoso... porque en estos años he recibido algo más que guía, paciencia, confianza y plena libertad intelectual. Al mismo tiempo que aprendí los entresijos de la cristalografía, recibí algo impagable, las bases, la confianza y la esperanza para poder trazar mi propio camino.

A mi Padre Juan, con esencia de artesano y el tesón de un revolucionario infatigable. Mi vocación científica nació cuando me enseñó que sólo el raciocinio, es capaz de dar forma a lo verdaderamente sublime... las ideas. “¡Piensa César, piensa, tienes que razonar siempre!... eso intento papá”.

A mi amigo Juan Luis Concepción (pero extensible a todos en el Laboratorio de Enzimología de Parásitos), porque mientras establecí en su laboratorio mi relación con la bioquímica, me desafió a razonar y sistematizar. Si en España me he convertido en doctor, allí en Venezuela, nací como investigador.

Seguiré con gente muy importante, aunque no sean los primeros de esta larga lista....

A Martín Martínez Ripoll, y aunque quizás pecaré de engreído, debo confesar que ha sido increíblemente reconfortante verme a través de sus ideas en momentos difíciles. He aprendido de él, algo infinitamente más valioso que a descifrar estructuras. Su amabilidad y humildad me acompañarán el resto de mi vida. Si de algo estoy orgulloso, es de poder contar con su estima.

A Shahriar Mobashery, porque lejos de ser un simple colaborador, me brindó confianza y libertad. Trabajar con él hace de la ciencia, aunque exigente, un mundo ameno.

Al resto de colaboradores, que han sido numerosos durante estos años. Especialmente a Lucia Rothman-Denes. Todos me han transmitido su pasión por el trabajo, esa sensación indescriptible de enamorarse de cosas etéreas. Yo también me he enamorado de los proyectos.

A los compañeros, porque siempre suman...

A los miembros del Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química-Física “Rocasolano” (IQFR), son muchos y por eso no daré una lista pormenorizada. Todos han sido importantes en distintos grados y maneras. Como en toda convivencia larga, he aprendido de cada uno de ellos, sin excepción, muchísimas cosas buenas, aunque otras quizás no tanto. Sin embargo, y es lo importante, el saldo siempre fue, es y será positivo. He reído y me he sulfurado, es mi naturaleza. Incluso en las situaciones

tensas siempre intenté extraer lo positivo. Dejaré a personas que estimo mucho cuando emprenda el camino lejos del IQFR. Las vivencias y el aprendizaje en el “Roca”, no se plasman en un título de doctor, pero sí, de forma intangible, en el carácter.

¡Bueno..., haré una lista!. Quiero agradecer especialmente a José Miguel Mancheño, Armando Albert, Julia Sanz, Alzoray (sí, mi mujer también trabaja en el “Roca”), Javier, Beatriz, Antonio (¿un cafelito?), Juana Mari, Lisandro, Iván, Yani, Siseth, Rocío, Maira, etc... Lo siento mucho, ¡intenté hacerla completa, pero es muy larga!

Porque la familia y amistades no necesariamente son fortuitas... ¡se puede elegir!.

A Pedro Enríquez, a Clara, a Miguel, y a sus familias sevillanas que crecen como la espuma, por hacernos sentir en familia a pesar de la profunda añoranza hacia nuestras raíces; dejar a tus seres queridos es quizás lo más difícil de emigrar en busca de un mejor futuro. Pero adoptar y/o ser adoptado por una nueva familia, con todas las consecuencias, es quizás lo más hermoso. Espero que pronto podamos volver a disfrutar de días de sol en las playas del Caribe (¡comiendo empanadas claro!).

A Tavo y Jessi, quién imaginaría que detrás de una simple mochila costeña se encontraba una amistad tan bonita. Por hacerme reír sin inhibiciones. Uno de los sacrificios más grandes de esta tesis ha sido no poder asistir a esa boda... “Toca que resarcirse hermano”.

A Pedro y Laura, que también son parte de la recompensa por los sacrificios. Todavía quedan muchos cafés, comidas y cervezas por tomar.

A Lisandro, porque las discusiones sobre ciencia son más gratas a pie de cancha; y hablar de fútbol también reconforta. Por siempre intentar, aunque en pocas ocasiones lograr, que cambie mi perspectiva sobre una idea.

A lo intangible (tomando prestadas algunas ideas)...

A Úrsula, Asimov, Bertrand, Houellebecq, Varley, Egan, Bradbury, Saramago, Disch (a Guido por tantas y tan buenas recomendaciones)... y otros tantos autores que han llenado mis días de aventura, júbilo, reflexión y otros muchos adjetivos que no lograré contabilizar. Y a la música, y cómo no, al baile...

A Galatea (*Canis familiaris*), porque su simplicidad me ha hecho más complejo y sobre todo más humano. ¡Ah, y por dejar al fin de orinarse en la alfombra!.

A muchos amigos que, ahora lejos, me hacen apreciar el valor de la amistad... Para la verdadera amistad el tiempo y la distancia son relativos. ¡Ninguna distancia es lejana, ni los años suponen mucho tiempo!

A todos, y aunque aquí debería añadir muchas más palabras, sólo una última y muy sincera...

¡GRACIAS!

PD: A Fundayacucho, los que pagaron hasta que su inoperancia me dejó sin dinero y sin opciones. Por eso debo hacer una aclaración: los becarios en el exterior somos algo más que números, no somos un gasto, no somos material de propaganda política y no somos unos aburguesados con suerte. Hacemos sacrificios gigantescos y nos hemos ganado con mucho trabajo lo que estamos cosechando. **Somos una inversión de futuro que realizan los ciudadanos**, no los burócratas desde su oficina. No prediquen esto de forma insustancial como hasta ahora, entiéndanlo, asúmanlo con compromiso y actúen en concordancia a ello, sólo así dejaremos de ser un país eternamente en vías de desarrollo.

RESUMEN

La propagación de las resistencias bacterianas a los antibióticos representa un grave problema de salud pública a nivel mundial, siendo la pared bacteriana la diana por excelencia de las terapias clínicas basadas en el uso de estos fármacos. En este trabajo, se abordan dos aproximaciones relacionadas con este tema. Por un lado, se estudia el mecanismo de reciclaje del peptidoglicano (PG) llevado a cabo por AmpD, una enzima que además es clave en la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, a través de la regulación de la expresión de β -lactamasas. Y, por otro, se aborda el estudio del mecanismo de translocación a membrana y lisis de la pared bacteriana llevada a cabo por Gp61, una endolisina codificada por el colifago N4, con potencial aplicación clínica como un novedoso “enzibiótico”.

AmpD es una amidasa de PG citosólica, que pertenece a la familia amidasa_2. Se han resuelto las estructuras cristalinas de AmpD de *Citrobacter freundii* en diversas conformaciones, la apoenzima, la holoenzima (a dos valores de pH) y el complejo con los productos de la reacción, revelando información detallada sobre el reconocimiento del sustrato y el mecanismo catalítico. La comparación con la estructura de la misma proteína resuelta por RMN, demostró la existencia de un mecanismo de activación, en donde la estructura de RMN representa el estado inactivo y la de rayos X el estado activo. La activación implica cambios conformacionales de hasta 17 Å concentrados en cuatro regiones específicas de la enzima, que representan el 30% de la proteína. Este cambio conformacional entre las estructuras inactiva y activa, constituye un mecanismo de activación sin precedentes para AmpD, y podría representar un sistema de regulación para los miembros intracelulares de la familia amidasa_2.

Los “enzibióticos” se usan como nuevas herramientas terapéuticas contra las infecciones bacterianas. Gp61 define una nueva familia de *N*-acetilmuramidases, la familia GH108, con características funcionales particulares (translocación y catálisis), como la presencia de un dominio transmembrana (DTM), con una baja homología en secuencia con los dominios SAR (*Signal Arrest-Release*). Se ha resuelto la estructura cristalina completa de Gp61 en su conformación soluble (activa), y su disposición espacial ha permitido definir, una tríada catalítica putativa. El dominio DTM, se constituye principalmente de una hélice α de 20 Å de longitud, con una característica anfipática moderada, y sus dimensiones indican que muy probablemente no sea capaz de atravesar por completo la membrana interna. Dicha hélice también está involucrada en la disposición general del sitio activo. Así, el DTM es esencial en ambos mecanismos, translocación y catálisis. Sorprendentemente, Gp61 es un dímero en su conformación soluble (activa), una característica anómala dentro de la superfamilia de las lisozimas. Todas estas novedades, hacen de Gp61 y la familia GH108 un modelo estructural novedoso, que abre paso a la investigación de nuevos tratamientos terapéuticos.

ABSTRACT

The spread of the bacterial antibiotics resistance represents a major problem in public health, where the cell wall is still the most important antibacterial target in clinical therapies. Herein, two approaches related to this issue are discussed. In this sense the peptidoglycan (PG) recycling process mediated by the AmpD amidase, and the mechanism of membrane translocation and PG hydrolysis mediated by Gp61, a phage-encoded endolysin, have been analyzed.

AmpD is a cytoplasmic PG amidase involved in bacterial cell wall recycling and in induction of β -lactamase, a key enzyme of β -lactam antibiotic resistance. The crystal structure of *Citrobacter freundii* AmpD has been solved in this study for the apoenzyme, the holoenzyme (at two different pH values), and the complex with the reaction products, providing insights into the PG recognition and the catalytic process. These structures are significantly different compared with the previously reported NMR structure for the same protein. The NMR structure does not possess an accessible active site and therefore represents an inactive “closed” conformation. The transition of the protein from this inactive conformation to the active “open” conformation, as seen in the X-ray structures, revealed large conformational rearrangements up to 17 Å in four specific regions, representing one-third of the entire protein. It is proposed that the large conformational change that would transform the inactive NMR structure to the active X-ray structure represents an unprecedented mechanism for activation of AmpD, and might be representative of a regulatory process in other intracellular members of the bacterial amidase₂ family of enzymes.

The enzybiotics (antibiotic enzymes) are used as a new class of therapeutic tools against bacterial infections. Gp61, an endolysin encoded by the *Escherichia coli* bacteriophage N4, is essential in the liberation of phages particles at the late state of their life cycle. Furthermore, Gp61 defines a new family of *N*-acetylmuramidases, family GH108, with unique functional characteristics (membrane translocation and catalysis), including a transmembrane domain (TMD) that exhibits a low sequential homology with the SAR (*Signal Arrest-Release*) domains. The crystal structure of the full-length Gp61 shows a fold defining the new lysozyme family, NMB1012-like. A catalytic triad has been proposed based on structural and sequence comparison. The TMD domain is constituted by a weakly hydrophobic α -helix of 20 Å long; its dimension precludes traversing completely the inner membrane. As the “transmembrane” helix is also a structural element of the catalytic site, the TMD is critical in both, translocation/release and catalysis. Surprisingly, the soluble conformation (active) of Gp61 is a dimer, an anomalous feature within the superfamily of lysozymes, which are expected to act as monomers. The novel characteristics of Gp61 and the GH108 family, pave the way for the development of new therapeutic treatments.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS. NECESIDAD DE NUEVAS DIANAS Y TERAPIAS ALTERNATIVAS	1
1.1.1. Resistencia a los antibióticos, un problema que se extiende	1
1.2. EL PEPTIDOGLICANO, LA DIANA QUIMIOTERAPEÚTICA POR EXCELENCIA	3
1.2.1. Características generales del peptidoglicano de <i>E. coli</i>	3
1.3. RECICLAJE DE LA PARED BACTERIANA	5
1.4. AMPD DE <i>Citrobacter freundii</i>	7
1.4.1. AmpD y su relación con la resistencia a los antibióticos	8
1.4.2. La estructura tridimensional de AmpD por RMN	9
1.5. LAS CONTRADICCIONES EN EL MODELO DE AMPD	10
1.6. LAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS A LOS ANTIBIÓTICOS	11
1.7. LAS MUREÍN HIDROLASAS	12
1.7.1. Endolisinas, una terapia clínica efectiva	14
1.8. MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN DE LAS LISINAS	16
1.9. GP61, UNA NUEVA FAMILIA DE MUREÍN HIDROLASAS	19
1.9.1. Características generales de Gp61	19
1.9.2. Mecanismo catalítico de lisis	20
1.9.3. Ubicación subcelular: la hélice transmembrana	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVOS GENERALES	23
3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	24
3.1. CRISTALOGRAFÍA DE MACROMOLÉCULAS: UNA VISIÓN GENERAL DEL PROCESO	25
3.2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS DEL PROCESO METODOLÓGICO	26
3.2.1. Introducción. La biología molecular al servicio de la cristalografía	26
3.2.2. Cristalización, punto crucial de la biología estructural	27
3.2.2.1. Los cristales de proteína	27
3.2.2.2. Principios y métodos de la cristalización de proteínas	29
3.2.2.3. Búsqueda de las condiciones de cristalización	32
3.2.3. Técnicas Cristalográficas	33
3.2.3.1. Difracción de los rayos X	33
3.2.3.2. Medida del espectro de difracción	34
3.2.3.2.1. Preparación de la muestra cristalina	35
3.2.3.3. Fuentes de radiación, la radiación sincrotrón	36
3.2.3.4. Procesado de los datos de difracción	37
3.2.4. Resolución Estructural, el problema de las fases	38
3.2.4.1. Métodos de dispersión anómala y Reemplazo Molecular para la resolución del problema de las fases	39

3.2.4.1.1. Breve introducción a la dispersión anómala	39
3.2.4.1.2. Métodos de dispersión anómala, MAD y SAD	40
3.2.4.1.3. El reemplazo molecular MR	41
3.2.4.3. Trazado de la cadena peptídica y refinamiento del modelo	42
3.3. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE AMPD	44
3.3.1. Síntesis de los substratos de AmpD	44
3.3.2. Producción de AmpD y marcaje con selenio-metionina	45
3.3.2.1. Estudios de actividad de AmpD	45
3.3.3. Cristalización de AmpD. Holoenzima, apoenzima, AmpD-SeMet y holoenzima a pH 5.5	46
3.3.3.1. Obtención de los complejos de AmpD con los productos de la reacción	48
3.3.4. Toma de los datos de difracción y resolución estructural	49
3.3.5. Cálculos de <i>Dinámica Molecular. Targeted Molecular Dynamics (TMD)</i>	50
3.3.6. Espectroscopia de Absorción de rayos X (XAS)	51
3.4. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE GP61	52
3.4.1. Clonaje, sobreexpresión y purificación de la Gp61 y Gp61-SeMet	52
3.4.2.1. Técnicas de cristalización de alto rendimiento, escalado y optimización de los cristales de Gp61 y Gp61-SeMet	52
3.4.3. Recogida de los datos de difracción de los cristales de GP61	53
3.4.4. Cálculo de las intensidades y factores de estructura	54
3.4.5. Cálculo de las fases y determinación de posiciones de los átomos de selenio	54
3.4.6. Resolución con <i>SHARP</i>	54
3.4.6.1. Determinación de los mapas de densidad electrónica	54
3.4.7. Construcción del modelo estructural de Gp61	54
3.4.8. Refinamiento del modelo	55
3.4.9. Obtención de complejos de Gp61 con substratos sintéticos análogos a la pared bacteriana de <i>E. coli</i>	55
3.4.10. Análisis de la estructura cuaternaria de Gp61. Experimentos de velocidad de sedimentación. Ultracentrifugación Analítica (UCA)	55
3.5. OTROS PROGRAMAS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES COMPLEMENTARIAS	56
3.5.1. Espectrometría de masas	57
3.5.2. Estimación de las concentraciones de proteína	58
4. RESULTADOS	
4.1. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE AMPD	59
4.1.1. Cristalización de la holoenzima	59
4.1.2. Recolección de los datos de difracción de la holoenzima	60
4.1.3. Resolución estructural de la holoenzima por <i>Reemplazo Molecular</i>	61
4.1.2. Resolución estructural <i>de novo</i> de la AmpD. Resolución de AmpD-SeMet, holoenzima, apoenzima, AmpD-pH 5.5 y AmpD-complejo	62

4.1.2.1. Cristalización de AmpD-SeMet, apoenzima, y AmpD-pH5.5	62
4.1.2.2. Resolución estructural y refinamiento de AmpD-SeMet holoenzima, apoenzima y AmpD complejo	62
4.1.3. Análisis general de la estructura cristalina de AmpD	64
4.1.3.1. Coordinación del Zn^{2+}	65
4.1.4. Comparación entre las estructuras de AmpD resueltas por rayos X y RMN	66
4.1.5. Mecanismo catalítico de AmpD	71
4.1.5.1. Características generales del sitio de unión a PG	71
4.1.5.2. Reconocimiento del peptidoglicano, detalle de la unión del sustrato y su relación con las regiones móviles	73
4.1.5.3. Comparación del reconocimiento del sustrato entre las estructuras de rayos X (abierta) y RMN (cerrada)	79
4.1.6. El cambio conformacional entre $^1\text{AmpD}$ y $^a\text{AmpD}$, activación de la enzima	81
4.1.6.1. Cambios conformacionales y la unión del ligando	81
4.1.6.2. La secuencia $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$	83
4.1.6.3. La región r3	86
4.1.7. La transición conformacional entre las estructuras inactiva y activa. Estudio por TMD	86
4.1.8. Efecto del pH en las estructuras de AmpD. Relación entre el cambio conformacional y la coordinación al Zn^{2+}	88
4.1.8.1. Espectroscopia de absorción de rayos X extendida EXAFS	89
4.1.9. Efecto de las vesículas lipídicas en la actividad de AmpD	90
4.2. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE GP61	91
4.2.1. Cristalización de Gp61	91
4.2.2. Recogida y procesamiento de los datos de difracción de Gp61 y Gp61-SeMet	91
4.2.3. “Faseado” <i>de novo</i> por el método de MAD	93
4.2.4. Construcción del modelo de Gp61 y refinamiento de la estructura	94
4.2.4. Descripción estructural de Gp61. Organización y plegamiento general	96
4.2.5. Análisis estructural del mecanismo de translocación	101
4.2.6. Hidrólisis del peptidoglicano, mecanismo catalítico	102
4.2.7. Estructura cuaternaria. Dimerización de Gp61	105
4.2.7.1. Ultracentrifugación Analítica por velocidad de sedimentación	108
5. DISCUSIÓN	111
5.1. ESTRUCTURA GENERAL DE AMPD	111
5.1.1. La coordinación del Zn^{2+} en AmpD y el efecto del pH en la estructura de AmpD	111
5.1.2. Reconocimiento del sustrato en la forma activa de AmpD	112

5.2. REESTRUCTURACIÓN DE AMPD: ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA	113
5.2.1. Transición conformacional entre los estados inactivo y activo analizada por TMD	114
5.3. LAS ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE AMPD EXPLICAN LOS DATOS BIOQUÍMICOS PRECEDENTES	114
5.3.1. Ubicación estructural y contexto funcional de las mutaciones de diversas <i>Enterobacteriaceae</i> que afectan la actividad de AmpD	114
5.3.2. Explicación estructural del estudio mutacional de AmpD de <i>Citrobacter freundii</i>	116
5.4. APROXIMACIONES AL DESENCADENANTE DE LA ACTIVACIÓN	117
5.4.1. ¿Por qué un mecanismo de activación en AmpD?	117
5.4.2. ¿Qué podría disparar el mecanismo de activación de AmpD?	117
5.5. ESTRUCTURA GENERAL DE GP61	119
5.6. EL MECANISMO DE TRANSLOCACIÓN DE GP61	120
5.7. GP61: UN MECANISMO CATALÍTICO COMPLEJO	123
5.8. LA CONFORMACIÓN SOLUBLE DE GP61 ES UN DÍMERO	125
<u>6. CONCLUSIÓN</u>	129
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	131
<u>8. ANEXOS</u>	147

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS. NECESIDAD DE NUEVAS DIANAS Y TERAPIAS ALTERNATIVAS

Figura 1.0. Relación temporal entre la implementación de los antibióticos y la aparición de las primeras cepas resistentes 1

Figura 1.1. Proporción del total de causas de muertes humanas anuales 2

1.2. EL PEPTIDOGLICANO, LA DIANA QUIMIOTERAPEÚTICA POR EXCELENCIA

Figura 1.2. Estructura de la cadena glicánica del peptidoglicano 4

Figura 1.3. Estructura tridimensional de un fragmento sintético de peptidoglicano y modelo de la pared según Meroueh *et al.* (2006) 5

1.3. RECICLAJE DE LA PARED BACTERIANA

Figura 1.4. Resumen de la fase inicial del reciclaje de la pared bacteriana hasta la acción de AmpD 6

1.4. AMPD DE *Citrobacter freundii*

Figura 1.5. Estructura tridimensional de AmpD resuelta por RMN 9

1.6. LAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS A LOS ANTIBIÓTICOS

Figura 1.6. Esquema del ciclo lítico de los bacteriófagos 12

1.7. LAS MUREÍN HIDROLASAS

Figura 1.7. Disposición esquemática de las paredes bacterianas 13

Figura 1.8. Estructura fina del peptidoglicano de *S. pneumoniae* y clasificación de mureín hidrolasas 13

1.8. MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN DE LAS LISINAS

Figura 1.9. Mecanismo de inserción-liberación de endolisinas con el dominio SAR 17

Figura 1.10. Esquema de isomerización de puentes disulfuro en el mecanismo de liberación y activación enzimática de Lyz^{P1} 18

1.9. GP61, UNA NUEVA FAMILIA DE MUREÍN HIDROLASAS

Figura 1.11. Alineamiento de secuencias de lisinas hipotéticas de diversos virus, que comparten homología con Gp61 20

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.1. CRISTALOGRAFÍA DE MACROMOLÉCULAS: UNA VISIÓN GENERAL DEL PROCESO

Figura 3.1. Esquema global del proceso de resolución estructural de una proteína por Cristalografía de rayos X 25

3.2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS DEL PROCESO METODOLÓGICO

Figura 3.2. Concepto de unidad asimétrica y celdilla unidad 28

Figura 3.3. Diagrama bidimensional de solubilidad de una proteína (diagrama de fases) 29

Figura 3.4. Cristalización mediante el método de difusión de vapor 31

Figura 3.5. <i>Ley de Bragg</i>	33
Figura 3.6. Construcción de la red recíproca a partir de las familias de <i>planos de Bragg</i> e interpretación de la difracción según el modelo de Ewald	34
Figura 3.7. Cristal montado en un lazo de nylon	35
Figura 3.8. Esquema general de un sincrotrón	36
Figura 3.9. Sistemas de imanes para la aceleración y redireccionamiento de las partículas en un sincrotrón	36
Figura 3.10. Esquema del cálculo de un mapa de densidad electrónica, $\rho(xyz)$	39
Figura 3.11. Variación de las componentes real e imaginaria del factor de dispersión atómico del selenio en función de la energía de los rayos X incidentes	40
Figura 3.12. Proceso esquemático del reemplazo molecular (MR)	42
Figura 3.13. Mapas de densidad electrónica	43
3.3. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE AMPD	
Figura 3.14. Substrato anhMurNAc- <i>L</i> -Ala- γ - <i>D</i> -Glu- <i>m</i> -DAP, compuesto 2	44
Figura 3.15. Microplacas Innovaplate™ SD-2 y robot de cristalización Innovadyne Nanodrop™ ExtY	47
Figura 3.16. Detector ADSC y sistemas de carga automática de cristales	49
4. RESULTADOS	
4.1. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE AMPD	
Figura 4.0. Cristales iniciales obtenidos en los experimentos de alto rendimiento	60
Figura 4.1. Cristales de AmpD salvaje obtenidos en la condición de cristalización escalada y optimizada manualmente	60
Figura 4.2. Patrón de difracción de la holoenzima	61
Figura 4.3. Estructura cristalográfica de AmpD	65
Figura 4.4. Imagen estereoscópica de la coordinación del ión metálico en la estructura de AmpD	66
Figura 4.5. Coordinación del ión catalítico de Zn^{2+}	67
Figura 4.6. Representación esquemática de la estructura secundaria de AmpD resuelta por rayos X y por RMN	68
Figura 4.7. Superposición de las estructuras de rayos X y RMN	68
Figura 4.8. Desviaciones cuadráticas a lo largo de la cadena peptídica	69
Figura 4.9. Desplazamiento de las cadenas laterales de los residuos R161 y E42	70
Figura 4.10. Complejo de AmpD con los productos de la reacción	71
Figura 4.11. Cavity de unión al anhMurNAc y superficie electrostática del sitio de unión a PG en AmpD	72
Figura 4.13. Comparación estructural de AmpD con las PGRPs	73
Figura 4.14. Detalle del reconocimiento del substrato por AmpD	74
Figura 4.15. Movimiento de la cadena lateral del Trp95	75
Figura 4.16. Participación del Zn^{2+} en la coordinación de la molécula de agua activada (HOH_1) y el biciclo AnhMurNAc	76
Figura 4.17. Coordinación del péptido en el sitio de la hidrólisis	76

Figura 4.18. Residuos involucrados en la coordinación del sustrato y que además pertenecen a las regiones móviles	77
Figura 4.19. Superposición de AmpD-complejo con AmiD en complejo con su sustrato, el anhMurNAc- <i>L</i> -Ala- γ - <i>D</i> -Glu- <i>L</i> -Lys	78
Figura 4.20. Superposición de los productos de la reacción, los compuestos 3 y 4 de AmpD-complejo (abierto) con AmpD-RMN (cerrado)	79
Figura 4.21. Detalle del cambio estructural de las regiones móviles r2 y r4	80
Figura 4.22. Cambios conformacionales entre ⁱ AmpD y ^a AmpD relacionados con la coordinación del péptido	82
Figura 4.23. Imagen estereoscópica del desplazamiento de la región r4 entre ⁱ AmpD y ^a AmpD	83
Figura 4.24. Ubicación del bucle ³⁹ PPGEFGGP ⁴⁶ en ^a AmpD	84
Figura 4.25. Reestructuración de la red de puentes salinos entre las conformaciones activa e inactiva	84
Figura 4.26. Cambio de la región r3 en el proceso de activación	85
Figura 4.27. Cambios conformacionales observados en AmpD durante la simulación por TMD	87
Figura 4.28. Imagen estereoscópica mostrando la superposición de la cadena principal de la holoenzima a pH 6.0 y a pH 5.5	88
Figura 4.29. Transformadas de Fourier de la señal de EXAFS	89
4.2. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE GP61	
Figura 4.30. Cristales de Gp61	92
Figura 4.31. Imagen del patrón de difracción de los cristales de Gp61-SeMet	93
Figura 4.32. Diagrama de Ramachandran del modelo refinado de Gp61	96
Figura 4.33. Distribución de la estructura secundaria de Gp61	96
Figura 4.34. Estructura general de Gp61	97
Figura 4.35. Representación de los factores atómicos de agitación térmica	98
Figura 4.36. Estructura del dominio de unión a peptidoglicano	99
Figura 4.37. Imagen estereoscópica de la superposición del dominio de unión a peptidoglicano de Gp61 con el de enzimas pertenecientes a la familia pfam09374	99
Figura 4.38. Conformación de la región variable en las lisozimas relacionadas estructural y filogenéticamente con Gp61	100
Figura 4.39. Detalle de la estructura de la hélice transmembrana (hélice TM) de Gp61 en su conformación soluble	101
Figura 4.40. Superposición de las regiones implicadas en la translocación de Gp61 y de R ²¹	102
Figura 4.41. Posición de la tríada catalítica putativa en Gp61	103
Figura 4.42. Comparación de las tríadas catalíticas de distintas lisozimas relacionadas estructural y filogenéticamente con Gp61	103
Figura 4.43. Imagen estereoscópica de los lazos catalíticos de las estructuras de Gp61 y la lisozima putativa de <i>N. meningitidis</i> superpuestos	104
Figura 4.44. Posición del glutámico catalítico de Gp61, E26, interactuando	

con la Gln71 de la región variable	105
Figura 4.45. Empaquetamiento de la tirosina conservada en la secuencia EGGY	105
Figura 4.46. Dímero cristalográfico de Gp61	107
Figura 4.47. Puentes salinos formados en la interfase de interacción de los monómeros de Gp61	108
Figura 4.48. Distribución de la probabilidad de los coeficientes de sedimentación (S) para la solución de Gp61 pura	109
5. DISCUSIÓN	
5.1. ESTRUCTURA GENERAL DE AMPD	
Figura 5.1. Relación estructural entre las regiones móviles de AmpD y la coordinación del sustrato	112
5.3. LAS ESTRUCTURAS CRISTALOGRAFICAS DE AMPD EXPLICAN LOS DATOS BIOQUÍMICOS PRECEDENTES	
Figura 5.2. Ubicación estructural de las mutaciones puntuales que afectan la actividad de AmpD en distintas enterobacterias	116
5.4. APROXIMACIONES AL DESENCADENANTE DE LA ACTIVACIÓN	
Figura 5.3. Región rica en residuos con carga positiva en la estructura inactiva de AmpD	119
5.6. EL MECANISMO DE TRANSLOCACIÓN DE GP61	
Figura 5.4. Hipótesis de interacción del dominio DTM con la membrana plasmática	121
Figura 5.5. Esquema del mecanismo de activación de R ²¹ y comparación con la estructura de Gp61	121
Figura 5.6. Ubicación de la “bisagra” molecular en el mecanismo de activación/translocación de Lys ^{P1} y comparación estructural con Gp61	122
5.8. LA CONFORMACIÓN SOLUBLE DE GP61 ES UN DÍMERO	
Figura 5.6. Dímero de Gp61 y proceso de inserción en la membrana	126

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

1.3. RECICLAJE DE LA PARED BACTERIANA

Tabla 1.0. Actividades enzimáticas y proteínas involucradas en el reciclaje de la pared bacteriana	6
---	---

1.5. LAS CONTRADICCIONES EN EL MODELO DE AMPD

Tabla 1.1. Propiedades de los mutantes más relevantes en la actividad de AmpD	10
--	----

1.7. LAS MUREÍN HIDROLASAS

Tabla 1.2. Enzibióticos con potencial en el tratamiento terapéutico de enfermedades	15
--	----

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS DEL PROCESO METODOLÓGICO

Tabla 3.0. Métodos para crear la sobresaturación	30
---	----

3.3. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE AMPD

Tabla 3.1. Compuestos utilizados para las medidas de actividad enzimática de AmpD	46
--	----

Tabla 3.2. Compuestos utilizados para obtener complejos con los cristales de AmpD	48
--	----

3.4. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE GP61

Tabla 3.3. Compuestos utilizados para obtener complejos con los cristales de Gp61	55
--	----

4. RESULTADOS

4.1. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE AMPD

Tabla 4.0. Condiciones de cristalización de la AmpD salvaje con resultados positivos en el barrido inicial de alto rendimiento	59
---	----

Tabla 4.1. Estadísticas del procesado de los datos de difracción de la holoenzima	61
--	----

Tabla 4.2. Condiciones de cristalización de las variantes de AmpD	62
--	----

Tabla 4.3. Estadísticas del procesamiento de los datos y refinamiento de todas las estructuras de AmpD	63
---	----

Tabla 4.4. Residuos involucrados en la coordinación del sustrato que pertenecen a las regiones móviles	77
---	----

Tabla 4.5. Parámetros estructurales obtenidos de los ajustes del EXAFS para las muestras de AmpD	90
---	----

Tabla 4.6. Efecto de las vesículas lipídicas en la actividad de AmpD	91
---	----

4.2. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE GP61

Tabla 4.7. Condiciones de cristalización de la Gp61 salvaje con resultados positivos en el barrido inicial de alto rendimiento	92
---	----

Tabla 4.8. Resumen del procesado de los datos cristalográficos de los cristales derivados de SeMet de Gp61	94
---	----

Tabla 4.9. Estadísticas del refinamiento de Gp61-SeMet	95
Tabla 4.10. Interacciones polares entre los monómeros de Gp61	106
Tabla 4.11. Residuos que conforman la superficie de interacción entre los monómeros	106

5. DISCUSIÓN

5.3. LAS ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE AMPD EXPLICAN LOS DATOS BIOQUÍMICOS PRECEDENTES

Tabla 5.1. Mutaciones puntuales que afectan la actividad de AmpD en diversas enterobacterias, y su contexto estructural y funcional	115
--	-----

ABREVIATURAS

anhMurNAc: ácido 1,6-anhydro-*N*-acetilmurámico

AmiD: 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa periplásmica bacteriana (anclada a membrana)

ampC: gen de AmpC, β -galactosidasa

AmpC: enzima β -galactosidasa

AmpD: gen de AmpD

AmpD: 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa citosólica bacteriana

AmpD-RMN: estructura tridimensional de la AmpD de *C. freundii* resuelta por RMN

AmpD-complejo: estructura cristalográfica de la AmpD de *C. freundii* en complejo con los productos de la reacción

AmpG: permeasa encargada de la internalización del muropéptido **1**

ampR: gen de AmpR, regulador de la expresión de la β -galactosidasa

AmpR: proteína reguladora de la expresión de la β -galactosidasa

C α : carbono α

C-terminal: carboxilo terminal

aR²¹: conformación activa de la endolisina del bacteriófago P21

DAP: ácido diaminopimélico dibásico

DTM: dominio transmembrana

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ESRF: *European Synchrotron Radiation Facility*

EXAFS: *Extended X-ray Absorption Spectroscopy*, espectroscopia de absorción de rayos X extendida

GlcNAc: *N*-acetilglucosamina

Gp61: *N*-acetilmuramidasa del bacteriófago N4 de *E. coli*

Hélice TM: hélice α anfipática que forma parte del dominio transmembrana de Gp61

iR²¹: conformación inactiva de la endolisina del bacteriófago P21 con la delección del dominio SAR

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

K_{cat}: constante catalítica

K_m: relación entre las constantes cinéticas de una reacción enzimática, medida inversa de la afinidad por el sustrato

L₁: lazo donde se ubica la tríada catalítica de Gp61 y también la de muchas otras lisozimas relacionadas estructural y filogenéticamente

Lys^{NM}: lisozima hipotética de *N. meningitidis* perteneciente a la familia GH108
Lyz^{P1}: endolisina del fago P1
Lys^{PG}: activador putativo secretado por *P. gingivalis*
N4: bacteriófago de *E. coli* con genoma linear de ADN doble cadena
N-terminal: amino terminal
NagZ: β -*N*-acetilglucosaminidasa citosólica bacteriana
MAD: *Multiple Anomalous Diffraction*, dispersión anómala múltiple
m-A₂pm: ácido diaminopimélico dibásico
MR: Reemplazo Molecular (*Molecular Replacement*)
MurNAc: ácido *N*-acetilmurámico
ORFs: *Open Reading Frame*, marco de lectura abierta
PG: péptidoglicano
PGRP/PGRPs: proteína(s) de unión a peptidoglicano
R²¹: gen de R²¹, endolisina del bacteriófago P1
R²¹: endolisina del bacteriófago P21
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
RMSD: desviación cuadrática media
S²¹: gen de la holina del fago P21
S²¹: holina del fago P21
SAD: *Single Anomalous Diffraction*, dispersión anómala simple
SAR: dominio de arresto y liberación de la membrana (*Signal Arrest-Release*)
TMD: dinámica molecular dirigida (*Targeted Molecular Dynamics*)
UCA: Ultracentrifugación Analítica
XAS: espectroscopia de absorción de rayos X

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS. NECESIDAD DE NUEVAS DIANAS Y TERAPIAS ALTERNATIVAS

1.1.1. Resistencia a los antibióticos, un problema que se extiende

El desarrollo de tratamientos clínicos basados en el ensayo y error, durante el periodo de auge de los antibióticos, representó el mayor avance para la humanidad en el tratamiento terapéutico de enfermedades infecciosas. Pero este avance se ha convertido en un arma de doble filo, que ha conducido a la selección activa de resistencias a los antibióticos en periodos relativamente cortos desde su implementación (figura 1.0). Por esta razón los niveles de mortalidad y morbilidad asociados a estas enfermedades se mantienen muy altos (Slama, 2008). Un tercio de las muertes humanas anuales se deben a enfermedades infecciosas, y entre ellas principalmente a las enfermedades respiratorias, particularmente neumonías (figura 1.1) (www.who.int/es & www.niaid.nih.gov). Debido a esto, la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en uno de los principales problemas en las patologías infecciosas, representando el talón de Aquiles de la medicina contemporánea (Gómez *et al.*, 2008).

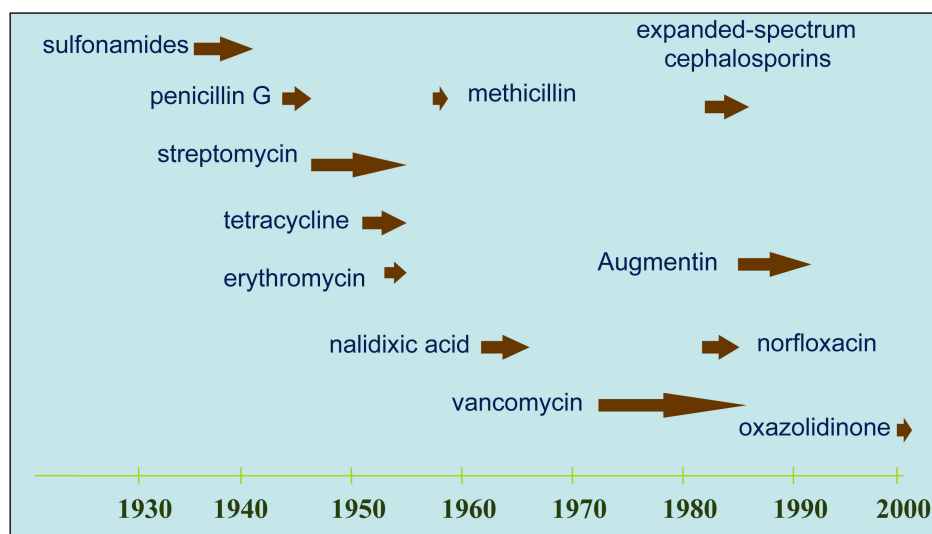


Figura 1.0. Relación temporal entre la implementación de los antibióticos y la aparición de las primeras cepas resistentes. El inicio de la flecha indica la fecha aproximada de implementación del antibiótico, mientras que la punta de la flecha, indica la fecha de aparición de la primera cepa resistente al mismo.

Al problema del uso descontrolado de los antibióticos, se une el del desarrollo y diseño de antibióticos enfocados principalmente a bacterias Gram-negativas, lo que también permite la evolución y selección lenta de resistencias en las bacterias Gram-positivas; aumentando y nutriendo de forma progresiva el número de patógenos resistentes (Baquero, 1997). El impacto clínico de este fenómeno, se traduce en un crecimiento significativo de la mortalidad y la morbilidad en infecciones relacionadas a especies multiresistentes como *Staphylococcus aureus* y otras muchas bacterias Gram-positivas (Baquero, 1997; Slama, 2008; Cottarel & Wierzbowski, 2007).

Metabólicamente, estas resistencias se relacionan con tres mecanismos biológicos esenciales: (i) la modificación bioquímica del antibiótico, (ii) la prevención del acceso del antibiótico a la diana específica y (iii) la alteración de la diana. Esta diversidad de mecanismos se suma a la complejidad de los sistemas de adquisición, transferencia y propagación de resistencias, que incluyen desde la propagación clonal (linaje genético) hasta la transferencia horizontal de genes integrados en partículas transferibles (transposones, integrones y diversos *clusters* genómicos). Esto genera un problema complejo y la necesidad inmediata de controlarlo (Baquero, 1997; Witte, 2004). Por todo ello, la búsqueda de nuevas dianas y el diseño racional de drogas, se perfilan como un pilar fundamental en el combate contra las enfermedades infecciosas y contra el aumento desmedido de las resistencias a nuestra principal arma de defensa, los antibióticos.

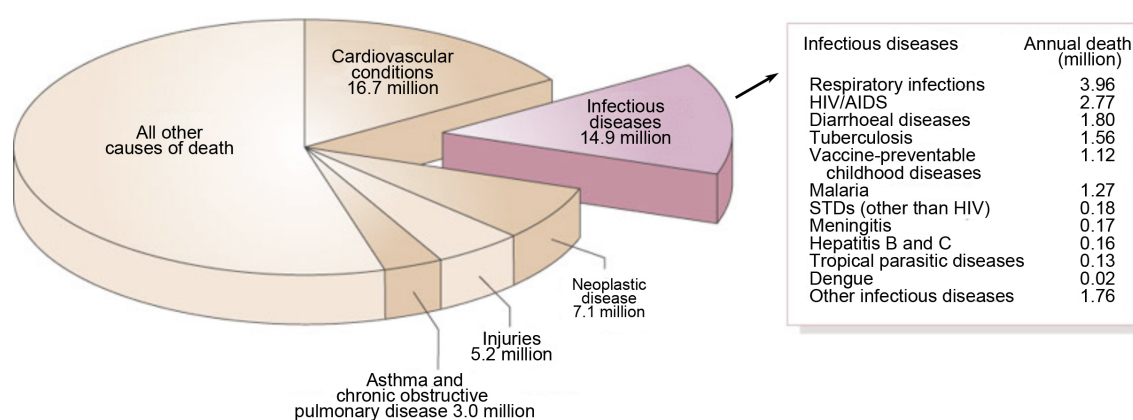


Figura 1.1. Proporción del total de causas de muertes humanas anuales. Como se observa, de entre las causas de muertes por enfermedades infecciosas, las enfermedades respiratorias son las que mayor repercusión tienen.

La escasez de nuevas familias y/o tipos de drogas y el retraso en la aparición de drogas derivadas de los tipos ya existentes refleja, en parte, los límites de nuestro modelo convencional *droga-diana*, un modelo basado en la inhibición de procesos esenciales de forma directa sobre una diana única y específica (Clatworthy *et al.*, 2007). A pesar de la gran cantidad de información que poseemos sobre los mecanismos de acción de los antibióticos, investigaciones recientes han demostrado que el compendio de consecuencias y respuestas fisiológicas que originan la muerte de las bacterias es muy complicado y también, por ende, la suma de las estrategias bacterianas para hacerse resistentes (Walsh *et al.*, 1996; Dwyer *et al.*, 2007; Kohanski *et al.*, 2007; Gusarov *et al.*, 2009; Kohanski *et al.*, 2010). Por tanto, es imprescindible, además de la búsqueda racional de diferentes dianas y antibióticos novedosos, desarrollar una aproximación más integral. Así, las investigaciones deberían orientarse hacia un entendimiento profundo de la modulación de los procesos que influyen en la susceptibilidad a los antibióticos. Además, es primordial identificar puntos comunes de vulnerabilidad, que puedan permitir el desarrollo eficaz de adyuvantes, nuevos antibióticos y estrategias alternativas que incluyan la combinación de múltiples drogas, proteínas y sistemas fisiológicos consortes de las dianas directas (Jovetic, *et al.*, 2010; Lee & Collins, 2012).

1.2. EL PEPTIDOGLICANO, LA DIANA QUIMIOTERAPÉUTICA POR EXCELENCIA

El *fitness* bacteriano depende de la integridad de la pared celular. Éste es el envoltorio capsular o sáculo de mureína formado por peptidoglicano y que rodea la membrana citoplasmática. La pared funciona como un exoesqueleto que proporciona protección contra la lisis (debido a la rigidez mecánica que aporta), regulación osmótica y una vía de intercambio específico e inespecífico de moléculas con el exterior (Salton, 1994). Por esta razón, la fisiología de la pared bacteriana, biosíntesis y reciclaje del peptidoglicano, es una excelente diana quimioterapéutica. De hecho, el peptidoglicano es la diana de las familias de antibióticos con mayor importancia y uso clínico histórico, como β -lactámicos (penicilina y cefalosporinas) y glicopéptidos (vancomicina) (Bugg *et al.*, 2011).

Además, la pared sirve como sistema de soporte y anclaje de una variedad importante de proteínas implicadas en procesos de crecimiento, división celular, y en las interacciones de la célula con el medio exterior. De esta forma, procesos en bacterias patógenas tan trascendentales como la invasión, adherencia, colonización y estimulación de la inflamación en el hospedador, dependen de las características moleculares y fisiológicas de la pared bacteriana (Bugg *et al.*, 2011).

Existe una amplia capacidad de investigación que contempla a la pared bacteriana como una diana con mucho margen de explotación. Y a ello contribuyen varios aspectos como la disponibilidad de intermediarios de la biosíntesis del peptidoglicano, (citoplasmáticos y periplásmicos), el desarrollo de ensayos que involucran a los intermediarios lipídicos, y el conocimiento acumulado sobre sus rutas bioquímicas (proteínas, genes, metabolitos intermediarios y regulación) (Jovetic *et al.*, 2010; Bugg *et al.*, 2011). Otras características de la biología de la pared bacteriana, han evidenciado la necesidad de entender profundamente cómo las bacterias consumen y reutilizan el peptidoglicano. Entre ellas la demostración de que el proceso de reciclaje de la pared bacteriana aporta hasta el 50% de los muropéptidos para la nueva generación (Goodell, 1985). Este proceso además provee de efectores (los mismos muropéptidos en los pasos citosólicos) para la inducción de β -lactamasas (Jacobs *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1996). También se suma el hecho de que la resistencia a la vancomicina depende en gran medida de la reestructuración de parte del peptidoglicano (Jovetic, *et al.*, 2010).

1.2.1. Características generales del peptidoglicano de *E. coli*

El peptidoglicano es un hetero-polímero compuesto de cadenas lineales de azúcares entrecruzadas con péptidos. En estas cadenas glicánicas se alternan la *N*-acetilglucosamina (**GlcNAc**) y el ácido *N*-acetilmurámico (**MurNAc**). Esta unidad disacárida presenta una cadena peptídica atípica, que contiene *D*-aminoácidos y que entrelaza las cadenas de azúcares (figura 1.2) (Scheleifer & Kandler, 1972). Los residuos terminales de las cadenas de azúcares, los conforman un disacárido formado por GlcNAc y 1,6-anhidroMurNAc (**anhMurNAc**), este último se corresponde a un MurNAc con un enlace éter intramolecular entre los carbonos 1 y 6 (C1 y C6) (figura 1.2) (Höltje *et al.*, 1975). El anhMurNAc terminal puede llegar a representar entre el 3 y 6% de las subunidades de mureína, dependiendo de la cepa y el estado de desarrollo/crecimiento de la bacteria. El grado de oligomerización promedio de las cadenas glicánicas es de unas 20 a 40 unidades de disacáridos, mientras que las cadenas

más cortas pueden tener cerca de 8 unidades. Los glico-oligómeros de mayor tamaño (por encima de 30 unidades) representan hasta el 30% del total de materia glicánica y tienen una longitud promedio de 45 unidades disacáridas (Glauner, 1988; Vollmer & Bertsche, 2008).

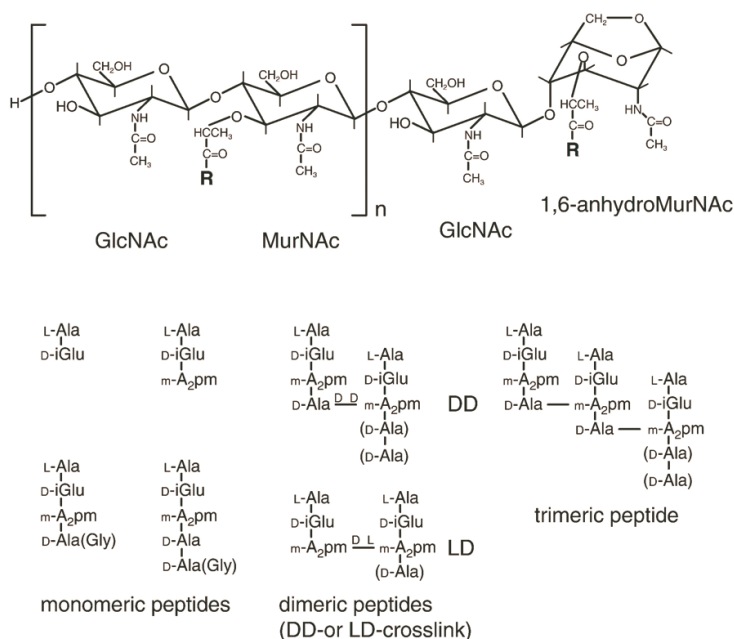


Figura 1.2. Estructura de la cadena glicánica del peptidoglicano con el azúcar terminal 1,6-AnhMurNAc (imagen superior). Las diversas cadenas peptídicas (imágenes inferiores) están unidas a la cadena glicosídica a través del MurNAc. En la imagen inferior se describen las cadenas peptídicas monoméricas que se pueden encontrar en el peptidoglicano y los enlaces (*D-D* o *L-D*) que forman para entrecruzarse. Imagen tomada y modificada de Vollmer & Bertsche (2008).

Los péptidos se encuentran unidos al grupo lactil del MurNAc por un enlace amida, y su secuencia recién sintetizada es *L-Ala-D-iGlu-m-A₂pm-D-Ala-D-Ala*. El ácido diaminopimélico (dibásico), *m-A₂pm* (DAP), se encuentra en la posición 3 y unido al *D-iGlu* a través de su centro *L* y el grupo γ -carbonilo del ácido glutámico. En *E. coli* la fracción de pentapéptidos en el sáculo de mureína es baja debido a la rápida proteólisis que sufren para formar tetrapéptidos (*L-Ala-D-iGlu-m-A₂pm-D-Ala*), tripéptidos (*L-Ala-D-iGlu-m-A₂pm*) y dipéptidos (*L-Ala-D-iGlu*). Estos, son redireccionados y reutilizados en diversas vías fisiológicas incluyendo el reciclaje de la pared bacteriana (Park, 1995; Vollmer & Bertsche, 2008).

En promedio, en *E. coli*, y en la mayoría de las bacterias Gram-negativas, entre el 40 y 60% de los péptidos se encuentran estableciendo un entrecruzamiento. El más común de ellos, el del tipo *D-D*, se forma entre el grupo carbonilo de la *D-Ala* de un péptido (posición 4) y el grupo amino del centro *D* del ácido diaminopimélico de un péptido contiguo (posición 3). También existe un número menor de enlaces entrecruzados entre los centros *L* y *D* de dos *m-A₂pm* de péptidos adyacentes. El entrecruzamiento permite formar una estructura rígida donde las cadenas peptídicas, debido a la disposición helicoidal adoptada por las cadenas glicánicas, se proyectan en las tres dimensiones (Barnickel *et al.*, 1979; Barnickel *et al.*, 1983). Así, las capas de mureína se disponen formando ángulos de 68° con las contiguas, favoreciendo la formación del mayor número de conexiones interpeptídicas posibles, y proporcionando a la pared bacteriana sus características particulares. La reciente determinación de la

estructura de un fragmento sintético de peptidoglicano por Meroueh *et al.* (2006), permite proponer un modelo estructural biológicamente muy verosímil tipo panal de abejas, donde las cadenas peptídicas entrecruzadas forman ángulos de 120° entre ellas. De esta forma, el conjunto forma espacios hexagonales que permitirían la acción y anclaje de la diversidad de proteínas que conforman el espacio periplásmico y la pared (figura 1.3).

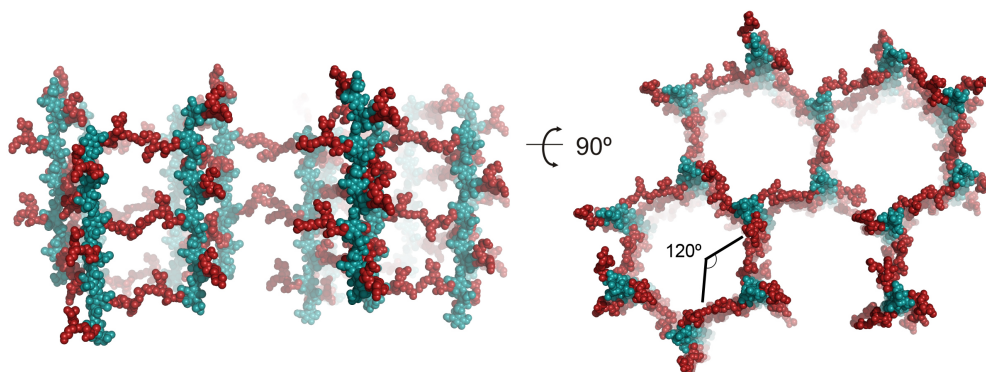


Figura 1.3. Estructura tridimensional de un fragmento sintético de peptidoglicano y modelo de la pared según Meroueh *et al.* (2006). Los azúcares (en azul) se disponen de forma perpendicular a la membrana, mientras que los péptidos entrecruzados (paralelos a la membrana) forman un ángulo de 120° que permite la formación de una estructura hexagonal muy fuerte y a la vez flexible.

1.3. RECICLAJE DE LA PARED BACTERIANA

La síntesis *de novo* del peptidoglicano, su regulación y estructura depende de un grupo cercano a 50 enzimas que trabajan en tres pasos generales (Typas *et al.*, 2012). Inicialmente (primer paso) los precursores nucleoprotéicos solubles (UDP-*N*-acetilglucosamina y UDP-*N*-acetilmuramilpentapéptido) son sintetizados en el citoplasma (Barreteau *et al.*, 2008; Typas *et al.*, 2012). El segundo paso se sucede en la membrana plasmática, donde los precursores nucleotídicos son ensamblados con el undecaprenil fosfato para formar los disacáridos pentapéptidos (lípidio II) y son translocados a través de ella (Bouhss *et al.*, 2008). En el tercer paso, el lípidio II es polimerizado y liberado del undecaprenil fosfato y la cadena glicánica resultante es insertada en la pared (Vollmer & Bertsche, 2008; Typas *et al.*, 2012).

El reciclaje de la pared bacteriana comprende nueve enzimas, una permeasa y una proteína periplásmica unida a membrana e involucrada en la recuperación de los productos de degradación de la pared (tabla 1.0) (Park & Uehara, 2008). Se cree que el reciclaje de la pared bacteriana, que aunque *in vitro* no es un proceso esencial (mutantes múltiples de las enzimas involucradas siguen siendo viables), está relacionado con varios factores como la necesidad de reparar la pared celular, el sistema de regulación durante la división y crecimiento celular, y para facilitar la transición al estado estacionario (Park, 1995). La poca importancia otorgada inicialmente a este proceso, cambió al demostrarse dos hechos interesantes: (i) *E. coli* es capaz de reciclar hasta un 50% del peptidoglicano por cada generación (Goodell, 1985; Park & Uehara, 2008); esta tasa fue calculada inicialmente entre el 0 y 8% por generación (Chaloupka & Strnadová, 1972), y (ii) que el reciclaje provee de muropéptidos que funcionan como efectores de la inducción de β -lactamasas (y por ende de la resistencia a antibióticos β -lactámicos) (Jacobs *et al.*, 1994). Además, se ha demostrado que el reciclaje de la pared bacteriana se encuentra íntimamente ligado al desarrollo de varias patologías, a

través de la liberación de fragmentos de peptidoglicano en bacterias causantes de graves infecciones en humanos como *Neisseria gonorrhoeae* (Garcia & Dillard, 2008). Por todas estas razones, el reciclaje y las proteínas involucradas en él, son un tema de investigación valioso para entender los complejos sistemas bacterianos de resistencia a los antibióticos y persistencia de las infecciones.

Tabla 1.0. Actividades enzimáticas y proteínas involucradas en el reciclaje de la pared bacteriana

Gen	Actividad	Localización
<i>ampG</i>	GlcNAc-anhMurNAc permeasa	Membrana interna
<i>ampD</i>	anhMurNAc-L-Ala amidasa	Citosol
<i>mpl</i> (<i>yjfg</i>)	UDP-MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-Dap ligasa	Citosol
<i>ldcA</i> (<i>gen f304</i>)	LD-Carboxipeptidasa	Citosol
<i>mpaA</i> (<i>ycjI</i>)	γ -D-Glu-Dap amidasa	Citosol
<i>ycjG</i>	L-Ala-D/L-glu epimerasa	Citosol
<i>nagZ</i> (<i>ycfO</i>)	β -N-Acetilglucosaminidasa	Citosol
<i>nagA</i>	GlcNAc-6-P deacetilasa	Citosol
<i>nagK</i> (<i>ycfX</i>)	GluNAc quinasa	Citosol
<i>anmK</i> (<i>ydH</i>)	anhMurNAc quinasa	Citosol
<i>murQ</i> (<i>yfeU</i>)	GlcNAc-6-P esterasa	Citosol
<i>amiD</i> (<i>ybjR</i>)	anhMurNAc-L-Ala amidasa	Membrana externa
<i>mppA</i>	Proteína de unión de péptidos a mureína	Periplasma

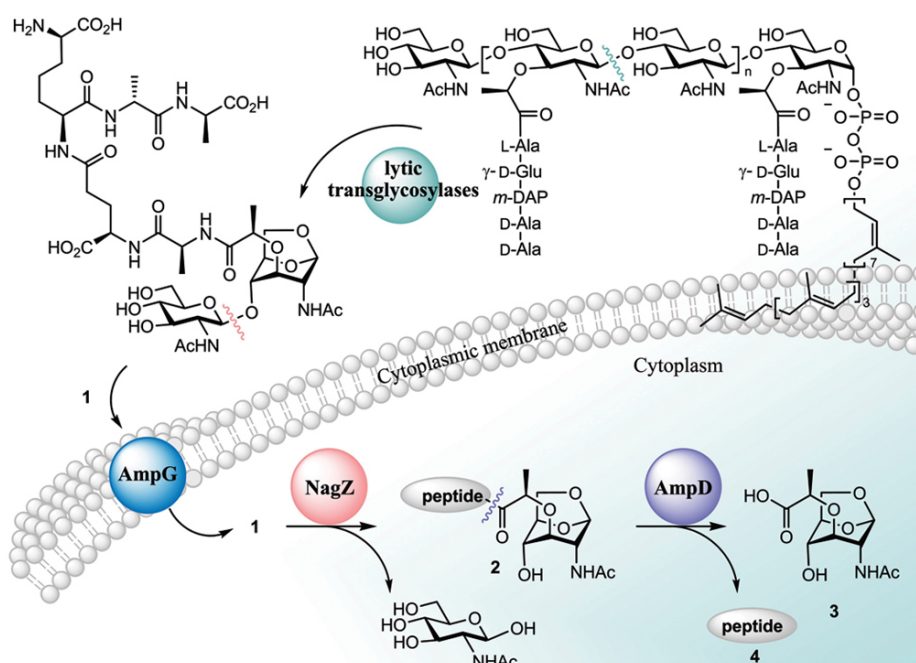


Figura 1.4. Resumen de la fase inicial del reciclaje de la pared bacteriana hasta la acción de AmpD. El compuesto 1 que resulta de la acción de las transglicosilasas líticas en el periplasma, es internalizado vía AmpG y luego convertido por NagZ en el compuesto 2. La versión tripeptídica del compuesto 2 es luego hidrolizada con mayor afinidad por AmpD, generando los compuestos 3 y 4 que continúan en el reciclaje. El compuesto 2 en su versión tripeptídica, está involucrado en la activación de las β -lactamasas.

La fase inicial del reciclaje de la pared bacteriana (hasta la acción de AmpD) (figura 1.4), comienza después de la actividad de las transglicosilasas líticas sobre el sáculo de mureína, como parte del proceso de síntesis y regulación de la pared. Estas enzimas hidrolizan el peptidoglicano y convierten la unidad de MurNac en 1,6-anhMurNac, lo que resulta en la liberación del disacárido-péptido **1 (GlcNAc-1,6-anhMurNac-péptido)**. El péptido del compuesto **1** que ha sido previamente procesado por un amplio número de enzimas, se compone de tres a cinco residuos (*L*-Ala-*D*-iGlu-*m*-A₂pm, *L*-Ala-*D*-iGlu-*m*-A₂pm-*D*-Ala ó *L*-Ala-*D*-iGlu-*m*-A₂pm-*D*-Ala-*D*-Ala). Al ser liberado el intermediario **1** como resultado de la hidrólisis específica del peptidoglicano, éste es internalizado por la proteína integral de membrana AmpG (Jacobs *et al.*, 1994; Park & Uehara, 2008). Una vez en el citoplasma, el compuesto **1** sirve de sustrato a la enzima NagZ, que corta el residuo de azúcar GlcNAc y lo convierte en el compuesto **2 (1,6-anhMurNac-péptido)**. Las variantes peptídicas más predominantes de este compuesto **2** son el tripéptido y el tetrapéptido. A su vez el compuesto **2**, en sus todas sus variantes peptídicas, es importante tanto para los posteriores eventos del reciclaje como en la inducción de la β -lactamasa. Posteriormente AmpD separa el péptido del azúcar generando los compuestos **3 (1,6-anhMurNac)** y **4 (péptido)**, que continúan con las fases posteriores del proceso de reciclaje. Particularmente AmpD posee una mayor afinidad por la versión del compuesto **2** que presenta una cadena peptídica de tres residuos (**1,6-anhMurNac-*L*-Ala-*D*-iGlu-*m*-A₂pm**) (Généreux *et al.*, 2004).

1.4. AMPD DE *Citrobacter freundii*

Citrobacter freundii, un bacilo Gram-negativo implicado en infecciones intrahospitalarias de pacientes inmunodeprimidos, es capaz (al igual que *E. coli*) de degradar hasta el 50% de su pared bacteriana en cada generación, para luego reciclar hasta el 90% de los productos de dicha degradación (Goodell, 1985; Lee *et al.*, 2009). El proceso de reciclaje comienza después de la acción de las transglicosilasas líticas cuyo producto (**1**) es internalizado por AmpG. Y es una vez en el citosol, cuando AmpD realiza su acción sobre el compuesto **2** (Goodell, 1985; Park, 1993).

AmpD (EC 3.5.1.28), con un peso molecular de 20.8 kDa (187 residuos) y perteneciente a la familia amidasa₂, es la única anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa citosólica de *C. freundii* y comparte cerca de un 90% de identidad con la AmpD de *E. coli* (Höltje *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1994; Liepnish *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009). Esta enzima posee una especificidad estricta por los muropéptidos que contienen azúcares del tipo 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil y por tanto no degrada los precursores citosólicos de la síntesis de mureína, como el UDP-MurNac-pentapéptido (UDP-*N*-acetilmuramil-*L*-alanil- γ -*D*-glutamyl-meso-diaminopimelil-*D*-alanil-*D*-alanina) (Jacobs *et al.*, 1995; Vollmer *et al.*, 2008). De esta forma, AmpD no interfiere con la biosíntesis, y se encarga de la regulación de las concentraciones de muropéptidos dirigidos al reciclaje.

AmpD corta el enlace amida entre el grupo lactil del 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil y el grupo α -amino de la *L*-Alanina de los tripéptidos y tetrapéptidos que conforman el compuestos **2**. Aunque también es capaz de cortar el mismo enlace en los compuestos disacáridos de tipo GlcNAc-1,6-anhidroMurNac-tripéptidos y tetrepéptidos (Park, 1993; Jacobs *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1995). La actividad amidasa de AmpD es específicamente dependiente de Zn^{2+} ; moléculas quelante como EDTA y

1,10-fenantrolina inhiben la actividad, mientras que la restitución del ión metálico la restablece. De hecho, la adición de otros iones metálicos divalentes distintos de Zn^{2+} (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} y Mn^{2+}) no son capaces de activarla (Généreux *et al.*, 2004). Según Jacobs *et al.* (1995), el valor de K_m para el monosacárido 1,6-AnhMurNAc-tripéptido es inferior a 150 μM ($K_{\text{cat}} = 30 \pm 10 \text{ s}^{-1}$), mientras que los valores de K_m calculados por Généreux, *et al.* (2004) para el disacárido GlcNAc-1,6-AnhMurNAc-tripéptido son superiores a 0.8 mM ($K_{\text{cat}}/K_m = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). La comparación entre la relación K_{cat}/K_m para ambos sustratos indica una afinidad muy superior por el sustrato monosacárido. Estos valores de afinidad sumados al fenómeno de la acumulación del 1,6-AnhMurNAc-tripéptido en bacterias con deleciones del gen *ampD*, apoyan la tesis de que la hidrólisis del compuesto **1**, por parte de NagZ, ocurre primero que la acción enzimática de AmpD en el proceso global del reciclaje.

1.4.1. AmpD y su relación con la resistencia a los antibióticos

Además del papel que juega AmpD en la ruta de reciclaje del peptidoglicano, su importancia también radica en la función que cumple como regulador indirecto de la inducción de la expresión de la β -lactamasa (Lindberg *et al.*, 1987; Jacobs *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1997).

En muchas bacterias Gram-negativas, la exposición a los antibióticos β -lactámicos en el medio de cultivo induce la expresión del gen *ampC*, y en consecuencia la síntesis de la enzima AmpC (Normark *et al.*, 1994). El gen *ampC* se encuentra controlado transcripcionalmente por el gen regulador *ampR*. La proteína reguladora AmpR posee dos propiedades: (i) por un lado es capaz, en presencia de inductores β -lactámicos, de activar la transcripción de *ampC*, y (ii) es capaz de inhibir la transcripción de su propio gen en presencia y ausencia de inductores β -lactámicos (Lindquist *et al.*, 1989; Høltje 1995; Jacobs *et al.*, 1997). Las deleciones de otro locus, *ampD*, que resultan en la acumulación de muropéptidos en el citosol, generan una hiperproducción constitutiva de AmpC que convierte a estos mutantes *ampD*⁻, en cepas considerablemente más resistentes (Jacobs *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1997). De forma sorprendente, la causa más común de sobreexpresión de β -lactamasa (AmpC) en cepas de diversas enterobacterias y de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de casos clínicos, es alguna mutación en *ampD* (Schmidtke & Hanson, 2006; Schmidtke & Hanson, 2008).

Durante el crecimiento bacteriano normal (en ausencia de inductores β -lactámicos) el regulador AmpR, expresado constitutivamente a bajas concentraciones, es mantenido en su forma inactiva a través de la formación de un complejo con el UDP-MurNAc-pentapéptido (Lindquist *et al.*, 1989; Jacobs *et al.*, 1997). En esta forma inactiva, AmpR se une a su propio operador ocasionando una supresión de la transcripción de *ampR* y por tanto una ausencia de activación del promotor de *ampC* (Normark *et al.*, 1994). Cuando las concentraciones de 1,6-AnhMurNAc-tripéptido aumentan en el citosol, debido al incremento de la degradación de la pared bacteriana (comúnmente ocasionado por la acción de los antibióticos β -lactámicos), los muropéptidos producidos son capaces de desplazar al UDP-MurNAc-pentapéptido del sitio de unión al inductor AmpR (Jacobs *et al.*, 1997). Como consecuencia se activa AmpR, que ahora es capaz de unirse al promotor de β -lactamasa e inducir la transcripción del gen *ampC*. El sistema permite de esta manera, censar las concentraciones de intermediarios de la biosíntesis y el reciclaje de la pared bacteriana, y actuar en base a la información de las concentraciones de los muropéptidos.

Finalmente, la actividad de AmpD juega un papel crucial en la activación de la resistencia a los antibióticos, ya que controla las concentraciones citosólicas del 1,6-AnhMurNAc-tripéptido.

1.4.2. La estructura tridimensional de AmpD por RMN

La estructura tridimensional de AmpD de *C. freundii*, la anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa mejor caracterizada bioquímicamente, ha sido resuelta por la técnica de *Resonancia Magnética Nuclear* (RMN) (Liepinsh *et al.*, 2003). El plegamiento de esta proteína comprende tres hojas β , cuatro hélices α y una hélice 3_{10} (figura 1.5). La distribución de la estructura secundaria es la siguiente: 3-5 (β_1), 7-8 (β_2), 12-14 (β_3), 31-33 (β_4), 46-53 (α_1), 62-69 (α_2), 76-79 (β_5), 83-87 (β_6), 100-102 (β_7), 105-107 (β_8), 115-117 (β_9), 127-143 (α_3), 147-149 (3_{10}), 151-152 (β_{10}) y 171-177 (α_4). La estructura de AmpD conserva el plegamiento general de las PGRPs (del inglés *Peptidoglycan Recognition Proteins*). Además posee una alta homología estructural con la lisozima del fago T7, y una homología aún mayor con el dominio catalítico de la *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa periplásmica AmiD, cuya estructura ha sido recientemente resuelta en complejo con el muropéptido 1,6-anhidroMurNAc-tripéptido (Kerff *et al.*, 2010).

La estructura reveló la coordinación del Zn^{2+} , vía los nitrógenos N δ 1 de los residuos His34 (ubicada en el lazo entre β_4 y α_1) e His154 (ubicada en β_{10}); y los dos oxígenos de la cadena lateral del Asp164 (lazo entre β_{10} y α_1). Esta coordinación es análoga a la que ocurre en la lisozima del fago T7 donde el aspártico es sustituido por una cisteína, e idéntica a la coordinación del Zn^{2+} en AmiD (Kerff *et al.*, 2010). Sin embargo, el modelo *in silico* del complejo de AmpD con el 1,6-anhMurNAc-tripéptido propuesto por Liepinsh *et al.* (2003), no aclara el mecanismo catalítico de la enzima ni la alta especificidad por el sustrato, ya que no se encontró una correlación con la información bioquímica y molecular (mutaciones sitio-específicas) documentada para esta metaloenzima (Généreux *et al.*, 2004).

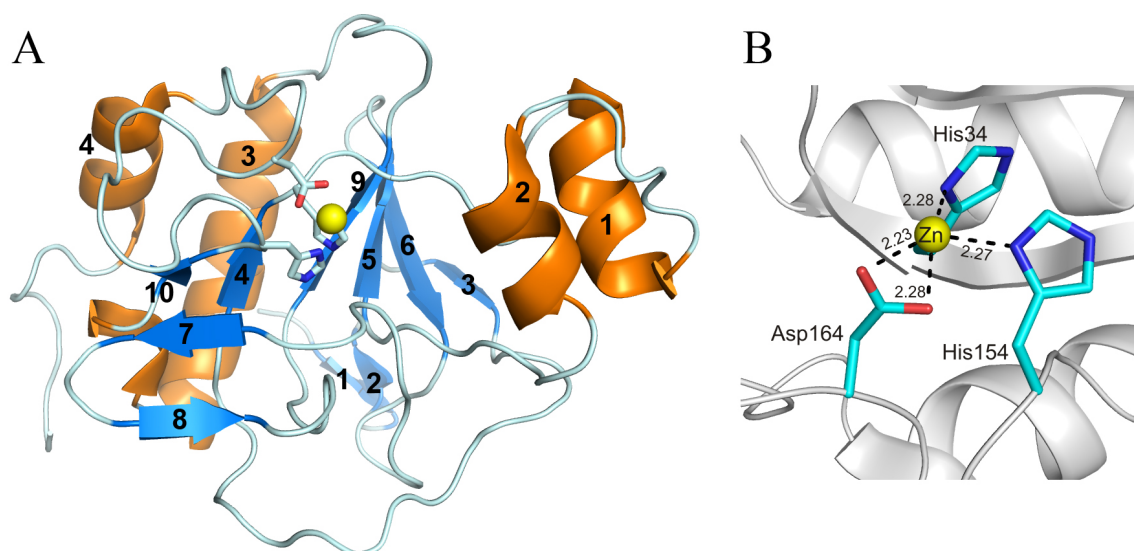


Figura 1.5. Estructura tridimensional de AmpD resuelta por RMN. (A) La estructura secundaria se representa por colores (láminas β en azul, hélices α en naranja) y en ella se enumeran las distintas láminas β y hélices α según lo descrito en el texto de la sección 1.4.2. La esfera amarilla representa el átomo de Zn^{2+} . (B) Coordinación del zinc.

1.5. LAS CONTRADICCIONES EN EL MODELO DE AMPD. INCONGRUENCIAS ENTRE LA INFORMACIÓN ESTRUCTURAL Y BIOQUÍMICA

Las distintas AmpDs bacterianas poseen una homología muy alta, lo que se traduce en una gran similitud estructural con la de *C. freundii*. Por tanto, las mutaciones deletéreas de estas enzimas deberían inactivar de igual manera a la AmpD de *C. freundii*. Una compilación reciente de mutaciones de nueve enterobacterias, reveló que los residuos correspondientes a las posiciones 1, 7, 33, 37, 80, 82, 83, 94, 95, 102, 117, 121, 127, 134, 146, 158, 164, 171 y 172, inactivan a la enzima y por tanto generan una expresión constitutiva de β -lactamasa (Petrosino *et al.*, 2002; Liepinsh *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2005). La mutación Met1 interfiere en la expresión de la proteína, y el Asp164 está involucrado en la coordinación del Zn^{2+} . Sin embargo, la identificación de las causas estructurales de la inactivación originada por las restantes mutaciones puntuales, no está aclarada en su gran mayoría. Sobre todo en los residuos que se encuentran con una exposición al solvente de un 100% y que además se ubican muy lejos del sitio activo putativo (la región cercana al Zn^{2+} y determinada por *docking* molecular). Asombrosamente, todas estas mutaciones tampoco permitieron mapear de manera consistente la ubicación exacta del sitio activo.

Tabla 1.1. Propiedades de los mutantes más relevantes en la actividad de AmpD

Enzima (mutación)	K_m/K_{cat} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_m/K_{cat} relativa (%)	Función conocida, o putativa del residuo mutado en base a los resultados bioquímicos	Incongruencias con la estructura de RMN
Salvaje	20000 ± 5000	100	_____	_____
H34A	<1	<0.2	Coordinación del Zn^{2+}	Corroborado por la estructura
H154A	2 ± 0.3	<0.2	Coordinación del Zn^{2+}	Corroborado por la estructura
H154N	15000 ± 3000	76	Coordinación del Zn^{2+}	Corroborado por la estructura
D164A	<1	<0.2	Coordinación del Zn^{2+}	Corroborado por la estructura
Y63F	3100 ± 300	16	Posible estabilización del sustrato Previamente ha sido propuesto por Liepinsh <i>et al.</i> (2003) como el residuo catalítico	Las distancias entre este residuo y el Zn^{2+} , además de los resultados bioquímicos no soportan la hipótesis de éste como residuo catalítico
E116A	<1	<0.2	Posible ácido catalítico	Este residuo no tiene acceso al sitio de corte, aunque sí se encuentra muy cercano al Zn^{2+}
K162H	140 ± 14	0.2	Posible estabilización del sustrato	Residuo muy alejado del sitio activo putativo
K162Q	33 ± 4	0.7	Posible estabilización del sustrato	_____

En este sentido el análisis más revelador, y el que presentó las mayores incongruencias con la estructura, es el realizado por Génèreux *et al.* (2004). En él, se mutaron los residuos involucrados en la coordinación del Zn^{2+} (H34A, H154A y D164A) y otros tres (E116A, K162 mutada por Q y H y Y63A), que finalmente derivaron en una inactivación total de la enzima (H34A, H154A, D164 y E116A) o una reducción evidente de su capacidad enzimática (Y63F, K162H y K162Q) (tabla 1.1). El

Glu116 es el único residuo cuya mutación (E116A) posee una K_m del mismo orden de magnitud al resultante de las mutaciones de los residuos que coordinan el Zn^{2+} ($< 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Este aminoácido se encuentra muy cerca del átomo de metal, aunque no expuesto. Por comparación con los mecanismos catalíticos de otras amidasas de la familia amidasa_2 como AmiD, debería funcionar como el ácido catalítico encargado de cortar el enlace entre la alanina y el azúcar del muropéptido (Kerff *et al.*, 2010). No obstante, en el modelo *in silico* del complejo con el muropéptido, este ácido no tendría acceso al enlace escindible del sustrato. El único residuo cercano al enlace mencionado y con capacidad putativa para hidrolizarlo, la Tyr63, no se encuentra a la distancia necesaria para que el mecanismo de hidrólisis dependa de él, e involucre al mismo tiempo al átomo de Zn^{2+} . Además, el mutante Y63A no presenta el suficiente porcentaje de inactividad que permita afirmar que se trata del residuo catalítico, tal como se propone en el trabajo de Liepinsh *et al.* (2003). No obstante, podría funcionar como un residuo involucrado en la estabilización del sustrato como sugiere el trabajo de Génèreux *et al.* (2004). Por otra parte, la Lys162, también se perfila como un residuo primordial en la estabilización del sustrato, como indican los resultados de actividad de los mutantes K162Q y K162H. Pero se ubica estructuralmente a una distancia aproximada de 20 Å del átomo de Zn^{2+} , y por tanto muy lejos del sitio activo putativo.

Todas estas incongruencias mantienen un debate que, hasta hoy, presenta resultados inconexos entre la estructura y la información bioquímica existente sobre la enzima. Por tanto, la falta de correspondencia, apunta a la necesidad de resolver estructuras de complejos proteína-ligandos que expliquen la realidad del mecanismo catalítico de AmpD.

1.6. LAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS A LOS ANTIBIÓTICOS

Aunque aparentemente contradictorio, las más novedosas alternativas terapéuticas a los antibióticos, las endolisinas codificadas por fagos (bacteriófagos), no son relativamente nuevas. La utilización de bacteriófagos para eliminar células de especies infecciosas, es anterior al descubrimiento de los antibióticos. Pero la efectividad demostrada por las penicilinas, sulfamidas y el conjunto de antibióticos posteriormente descubiertos, desplazó de forma inmediata a cualquier alternativa posible. Por lo que la inversión en el desarrollo de esta área de investigación, mermó en poco tiempo en los países occidentales provocando finalmente su abandono (Fischetti, 2006; Hermoso *et al.*, 2007).

Con el aumento actual de la resistencia a los antibióticos, se incrementó el interés en estas alternativas y en el control estricto sobre el uso clínico de los antibióticos. En esta búsqueda de alternativas, se ha renovado la visión de los fagos no filamentosos (su contraparte, los filamentosos no tienen capacidad bactericida) como una fuente de posibles soluciones (Russel *et al.*, 1997; Borisowski *et al.*, 2005; Hermoso *et al.*, 2007). La muerte celular causada por los fagos no filamentosos se produce durante la liberación de su progenie en la fase tardía de su ciclo de vida (figura 1.6). Este ciclo se inicia con la infección de la bacteria y comprende la expresión inicial del genoma (ADN o ARN) de los fagos, utilizando la maquinaria fisiológica del hospedador. Posteriormente, y una vez completados los procesos metabólicos necesarios, se expresan y transportan proteínas hasta la membrana celular, que son las encargadas de liberar a la progenie por medio de la lisis celular. Este proceso ocurre al inhibir la

síntesis de la pared o, preferentemente, desestabilizándola gracias a la acción hidrolítica de las endolisinas. Estas lisinas son mureín hidrolasas muy específicas que rompen enlaces estructurales del peptidoglicano, causando de esta forma una lisis osmótica que conlleva a la liberación de los viriones y a la continuidad del ciclo (Young *et al.*, 2000; Loessner, 2005).

En este sentido, la diversidad de los virus (que representan el ente biológico más abundante de la biósfera) y particularmente las mureín hidrolasas con su alta especificidad y efectividad bactericida, se perfilan como una fuente potencial, muy rica, de alternativas clínicas a los antibióticos.

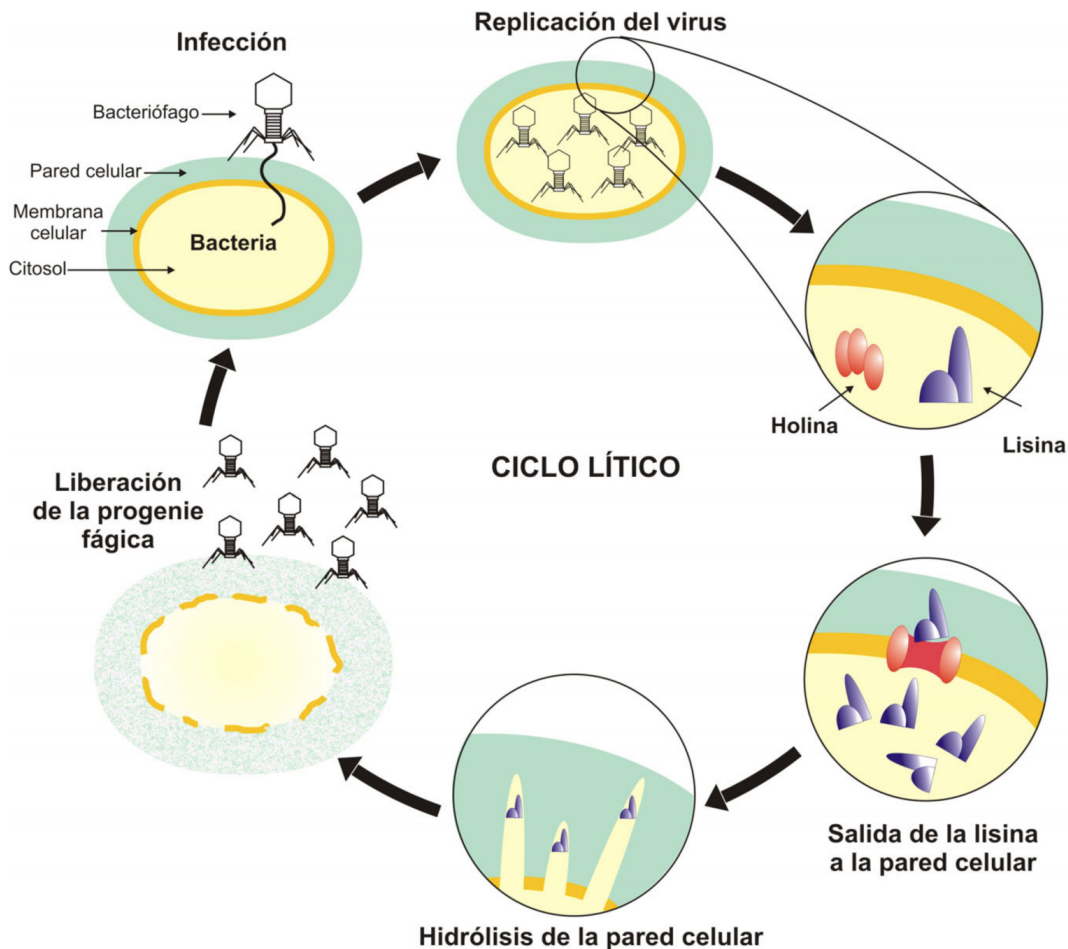


Figura 1.6. Esquema del ciclo lítico de los bacteriófagos. Una vez infectada la bacteria y bajo ciertas condiciones fisiológicas (que dependen de cada bacteriófago y hospedador particular) comienza la replicación del virus utilizando la maquinaria replicadora de la célula hospedadora; en el momento fisiológicamente controlado, las lisinas codificadas en el genoma del fago son liberadas degradando la pared celular y provocando su ruptura. A continuación la progenie fágica es liberada y el ciclo continúa. Figura tomada y modificada de Hermoso (2007).

1.7. LAS MUREÍN HIDROLASAS

La pared bacteriana es una estructura compleja que, a pesar de mantener la misma base molecular, varía enormemente entre bacterias Gram-positivas, Gram-negativas (figura 1.7 A y B) y entre especies. Dicha complejidad ha derivado en la evolución de

diversas actividades hidrolíticas muy específicas, que además permite clasificarlas. En la figura 1.8 se muestra la clasificación de las mureín hidrolasas (basada en el sitio de corte específico) para el caso de las moléculas de peptidoglicano de *S. pneumoniae*, uno de los patógenos humanos causante de mayor morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Baquero, 1997; Slama, 2008; Hermoso *et al.*, 2007).

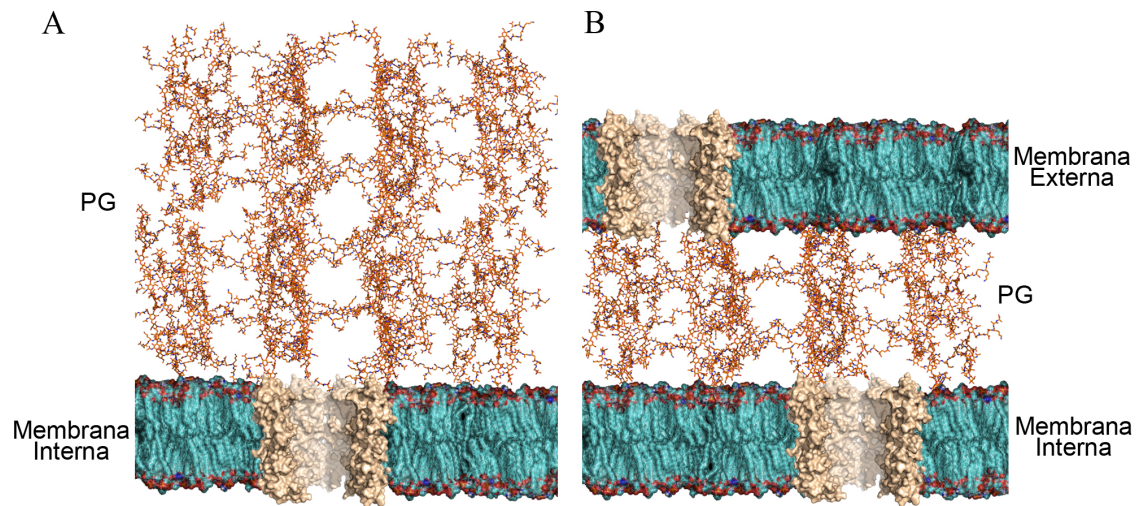


Figura 1.7. Disposición esquemática de las paredes bacterianas. (A) Pared de las bacterias Gram-positivas. (B) Pared de las bacterias Gram-negativas, en este caso particular la pared bacteriana es menos densa que su equivalente en Gram-positivas, además se encuentra aislada del medio ambiente por una segunda doble capa lipídica (membrana externa). PG: peptidoglicano.

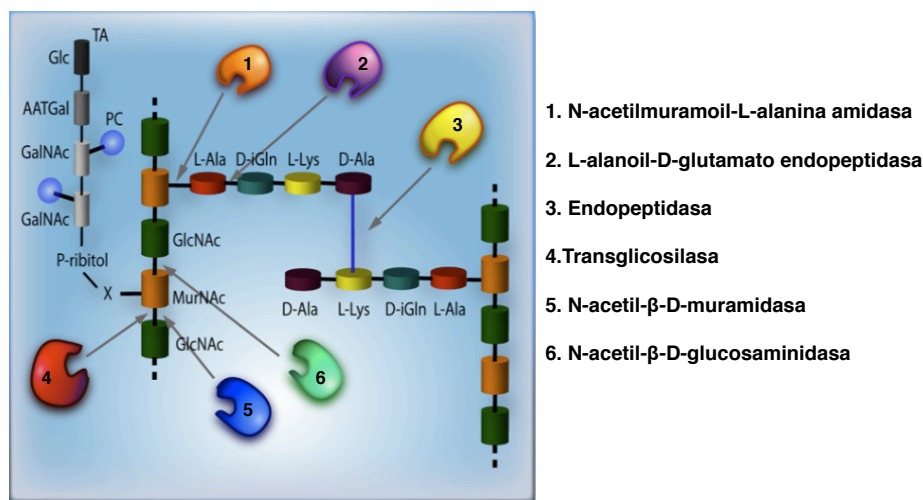


Figura 1.8. Estructura fina del peptidoglicano de *S. pneumoniae* y clasificación de mureín hidrolasas conocidas según su sitio específico de corte. Figura tomada y modificada de Hermoso *et al.* (2007).

Las lisinas codificadas por fagos (endolisinas) comparten con sus análogas de bacterias (autolisinas) características generales del mecanismo molecular de hidrólisis y reconocimiento del sustrato; diferenciándose en la función que desempeñan durante el ciclo lítico de los fagos o en el metabolismo celular de las bacterias (Tomasz, 1974; Loessner, 2005). Ambas familias, endolisinas y autolisinas, poseen una estructura

modular compuesta por un dominio catalítico, usualmente ubicado en el N-terminal, y un dominio de reconocimiento y unión al sustrato, generalmente en el C-terminal. Esta homología proviene de compartir ancestros comunes; además existe una amplia evidencia de que la co-evolución desencadenó el intercambio de dominios funcionales (transferencia horizontal de genes, muy común en relaciones parásito-hospedador) (Díaz *et al.*, 1990; Díaz *et al.*, 1991). Este intercambio de dominios ha sido estudiado más específicamente en la relación entre *S. pneumoniae* y algunos de sus fagos; demostrándose que la alta homología existente entre las lisinas de bacterias y sus fagos sólo puede explicarse por el intercambio de información genética (Díaz *et al.*, 1990; Díaz *et al.*, 1991; Loessner, 2005). A pesar de ello no todas las lisinas poseen esta composición modular, existiendo muchas enzimas (como la del fago T7) con un único dominio globular (Cheng *et al.*, 1994; Borisowski *et al.*, 2005).

El mecanismo catalítico de las mureín hidrolasas se encuentra muy conservado y ha sido ampliamente estudiado, incluyendo su estructura molecular. A pesar de esto, fue sólo después de la determinación estructural de Cpl-1 (lisina del fago Cp-1 de *S. pneumoniae*) en complejo con análogos de PG, que se pudo descifrar los mecanismos de reconocimiento y estabilización de sustrato en esta familia de lisinas (Hermoso *et al.*, 2003; Pérez-Dorado *et al.*, 2007).

1.7.1. Endolisinas, una terapia clínica efectiva

Las mucosas humanas son un blanco de rápida colonización por diversos patógenos entre los que destacan *S. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis* y *S. aureus* principalmente (Bogaert *et al.*, 2004). En este sentido es evidente que impedir la colonización o reproducción excesiva de comensales del tracto respiratorio traería como consecuencia una disminución significativa, a nivel mundial, en la incidencia de infecciones (Loessner, 2005).

Los primeros indicios sobre el potencial de las lisinas como terapia clínica en el tratamiento de infecciones bacterianas, proviene del descubrimiento de la actividad muramidasa de proteínas pertenecientes a fagos, especialmente en bacterias Gram-positivas (Bernhardt *et al.*, 2002). Actualmente ha sido ampliamente demostrada la capacidad de las endolisinas como un potencial tratamiento terapéutico (Borisowski *et al.*, 2005). Sin embargo, requirió un período de 40 años, entre los estudios iniciales aplicando lisozimas parcialmente purificadas de forma exógena en cultivos bacterianos, hasta demostrar que las endolisinas recombinantes funcionan como un agente bactericida muy eficaz (Young, 1992; Bernhardt *et al.*, 2002).

Las endolisinas poseen una amplia diversidad de aplicaciones biotecnológicas potenciales. En medicina humana, pueden destacarse la eliminación de bacterias en mucosas y el tratamiento general de infecciones (Loeffler *et al.*, 2001; Fischetti, 2003). Otras áreas importantes y relacionadas de forma directa con humanos incluyen el biocontrol en alimentos; donde destaca la actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus* en leche de consumo humano (Loessner, 2005; Obeso *et al.*, 2008) y la protección de plantas en infecciones por fitopatógenos a través de la expresión de genes de lisinas insertados en su genoma (Düring *et al.*, 1993; Hanke *et al.*, 1998).

La primera endolisina recombinante utilizada en investigaciones como un agente antibacteriano, provenía del fago C1 del grupo C de cepas de *Streptococci* (Nelson *et al.*, 2001). Estos experimentos demostraron una alta efectividad en la eliminación *in vitro* de 10 cepas del grupo A de *Streptococci*. Sin embargo se obtuvo

una menor sensibilidad por parte de las cepas del grupo C y E mientras que los grupos B, D, F, G, L y N presentaron resistencia (Nelson *et al.*, 2001; Borysowski *et al.*, 2005). También fue probada con cepas de colonización oral obteniéndose resultados poco alentadores, ya que únicamente una cepa de *Streptococcus gordonii* mostró apenas una baja sensibilidad, mientras que otras Gram-positivas y casi todas las Gram-negativas presentaron una completa resistencia. No obstante, estos resultados demostraron el potencial de descolonización que poseen las endolisinas y además su alta especificidad (Bernhardt *et al.*, 2002; Borysowski *et al.*, 2005).

Tabla 1.2. Enzibióticos con potencial en el tratamiento terapéutico de enfermedades

Enzibiótico	Origen	Pruebas	Resultados y aplicaciones potenciales
Endolisina de C1	Fago C1 (grupo C de cepas de <i>Streptococcus sp.</i>)	<i>In vitro</i> : cultivos bacterianos <i>In vivo</i> : en ratones infectados por diversas cepas de <i>Streptococcus sp.</i>	Efectividad para eliminar <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> diversas cepas del grupo A de <i>Streptococcus sp.</i> Tratamiento en infecciones cutáneas y mucosas.
Cpl-1	Fago Cp-1 de <i>S. pneumoniae</i>	<i>In vitro</i> : cultivos bacterianos <i>In vivo</i> : ratones infectados por diversas cepas de <i>S. pneumoniae</i>	Descolonización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de diversas cepas de <i>Streptococcus sp.</i> prevención de la otitis media. Tratamiento en infecciones cutáneas y mucosas; tratamiento de endocarditis por neumococos.
PAL amidasa	Fago DP-1 de <i>S. pneumoniae</i>	<i>In vitro</i> : cultivos bacterianos <i>In vivo</i> : ratones infectados por diversas cepas de <i>S. pneumoniae</i>	Descolonización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de diversas cepas de <i>Streptococcus sp.</i> resistentes a penicilina. Tratamiento en infecciones cutáneas y mucosas.
Endolisina de phi11	Fago phi11 de <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>In vitro</i> : cultivos bacterianos de diversas cepas causantes de la mastitis bovina	Lisis de <i>S. aureus</i> , <i>S. simulans</i> y CoNs <i>in vitro</i> , los mayores causantes de la mastitis (infección de las glándulas mamarias bovinas) en el mundo. Tratamiento antimicrobiano de mastitis y biocontrol de alimentos.
PlyGBS	Fago NCTC 11261 de <i>S. agalactiae</i>	<i>In vitro</i> : cultivos bacterianos <i>In vivo</i> : ratones infectados por diversas cepas causantes de infecciones en genitales y tracto digestivo en humanos	Actividad bactericida específica contra <i>S. agalactiae</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>L. crispatus</i> . Tratamiento de infecciones vaginales e infecciones de neonatos asociadas al parto.
PlyG	Fago Y de <i>B. anthracis</i>	<i>In vitro</i> : cultivos bacterianos de <i>B. anthracis</i>	Lisis <i>in vitro</i> de todas las cepas de <i>B. anthracis</i> no benignas aisladas incluyendo las encapsuladas y una cepa de <i>B. cereus</i> . Control de armas biológicas.
LysH5	Fago phiH5 de <i>S. aureus</i>	<i>In vitro</i> : leche bovina contaminada por <i>S. aureus</i> (cepa humana y bovina) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (cepa humana)	Disminución de la turbidez (muerte celular) en leche pasteurizada contaminada por cepas humanas y bovinas de <i>Staphylococcus sp.</i> Biocontrol de alimentos.
LysK	Fago K de <i>Lactococcus lactis</i>	<i>In vitro</i> : cultivos bacterianos de diversas cepas de <i>Staphylococcus sp.</i>	Descolonización <i>in vitro</i> de diversas cepas de <i>Staphylococcus sp</i> incluyendo las resistentes a meticilina. Tratamiento en infecciones cutáneas y mucosas.
PlyV12	Fago phi1 de <i>E. faecalis</i>	<i>In vitro</i> : cultivos bacterianos de diversas cepas de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> además de cepas de los grupos C y B de <i>Streptococcus sp.</i>	Actividad bactericida de amplio espectro. Tratamiento en infecciones clínicas con diversas cepas resistentes a vancomicina y cepas de los grupos C y B de <i>Streptococcus sp</i> resistentes a Cpl-1 y PAL.
Endolisina de B30	Fago B30 de <i>S. agalactiae</i>	<i>In vitro</i> : diversos cultivos bacterianos	Altamente eficaz con cepas de los grupos A, B, C, E y G. Uso potencial en el tratamiento de infecciones vaginales causadas por <i>S. Agalactiae</i> debido a que el pH óptimo de la enzima es el mismo que el de la pared vaginal. Aún no ha sido probada <i>in vivo</i> .

La actividad lítica de esta endolisina es inmediata; cultivos con una masa celular de 10^7 células fueron eliminadas con la adición de 1000U de enzima en apenas 5 segundos. Además la aplicación (una dosis) *in vivo* en mucosas orales y tracto respiratorio de ratones con el mismo título de bacterias fue suficiente para eliminar y proteger de la colonización por diversas cepas del grupo A de *Streptococci* (Borysowski *et al.*, 2005).

Alentados por resultados prometedores, se realizaron investigaciones con otras dos endolisinas de fagos de *S. pneumoniae* previamente caracterizadas, Pal del fago Dp1 y Cpl-1 del fago Cp-1 (Gracia *et al.*, 1987; Sheehan *et al.*, 1997). Ambas endolisinas corroboraron los resultados anteriormente obtenidos, es decir, una alta eficiencia en la eliminación de bacterias *in vitro*, sumado a la eliminación del patógeno en modelos murinos y una amplia protección contra los procesos de colonización. Sin embargo, ambas lisinas restringen su actividad lítica a *S. pneumoniae*, eliminando todas las cepas probadas incluyendo las resistentes a penicilina (Loeffler *et al.*, 2001; Loeffler *et al.*, 2003).

Cpl-1 y Pal también han sido probadas en el tratamiento de infecciones generalizadas (diversos tejidos y órganos internos) mostrando resultados prometedores (Jado *et al.*, 2003). La eficacia de los experimentos dependió, generalmente, de la dosis administrada a los ratones vía intravenosa e intraperitoneal. Estos trabajos concluyeron la necesidad de administrar varias dosis debido a la corta vida media de las enzimas en el torrente sanguíneo. Aunque no existen trabajos de comparación directa de las eficiencias entre antibióticos y enzibióticos, es evidente que ambos se encuentran en un rango similar e incluso existe evidencia de una mayor eficacia de las endolisinas en algunos modelos murinos (Borysowski *et al.*, 2005). A medida que avanzan las investigaciones, se prueban nuevos enzibióticos obteniéndose resultados promisorios en el tratamiento de diversos tipos de infecciones. Estas incluyen infecciones genitales, en las cuales el pH del medio en el que deben actuar las enzimas es una limitación importante; también en infecciones bovinas como la mastitis, cuyos resultados podrían ser extrapolados a tratamientos clínicos en diversos mamíferos (Cheng *et al.*, 2005; Donovan *et al.*, 2006). En la tabla 1.2 se muestra un resumen de los enzibióticos con resultados positivos en pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Una conclusión común de los análisis de tratamientos clínicos, fue la resistencia demostrada por bacterias Gram-negativas a los enzibióticos (la mayoría de ellos provenientes de fagos de Gram-positivas) (Borysowski *et al.*, 2005). Esta resistencia se encuentra asociada a las características estructurales de la pared de bacterias Gram-negativas (figura 1.7 B), que poseen una membrana lipídica externa que aísla el peptidoglicano (la diana) evitando la acción letal de las lisinas. Por esta razón los mecanismos de translocación de endolisinas y autolisinas a la membrana plasmática también representan un área importante de investigación para el desarrollo de tratamientos clínicos contra patógenos Gram-negativos.

1.8. MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN DE LAS LISINAS

En general las endolisinas carecen de señales que sean reconocidas por el sistema secretor del hospedador y, por tanto, el acceso al peptidoglicano depende de las holinas. Estas son proteínas codificadas por el genoma viral que, en el momento genéticamente determinado, se expresan y oligomerizan en la membrana bacteriana formando poros

que permiten el paso de las lisinas desde el interior celular (Young, 1992; Young *et al.*, 2000). En este mecanismo de translocación, las endolisinas se acumulan completamente plegadas y enzimáticamente activas en el citosol celular, de forma previa a la permeabilización de la membrana causada por las holinas (Young, 1992; Young *et al.*, 2000).

El mecanismo de disrupción de la membrana dependiente de holinas, y el momento en el que este ocurre, sigue siendo desconocido. Diversos autores proponen una disrupción dependiente del estado energético y la polarización de la membrana, en detrimento de la tradicional hipótesis de acumulación crítica de lisinas en el interior celular (Gründling *et al.*, 2001). Mientras que otros estudios plantean hipótesis basadas en una “activación” de endolisinas previamente translocadas a la pared celular (en su forma inactiva) como el caso de la amidasa LytA de *Streptococcus sp.* (Young *et al.*, 2000). Es evidente que existe una diversidad de mecanismos por los cuales el fenómeno de ruptura de la membrana ocurre (algunos de ellos por determinar), y que la actividad de las holinas dista de ser una simple permeabilización de la membrana, ya que podrían participar de forma directa en otros procesos celulares (Gründling *et al.*, 2001).

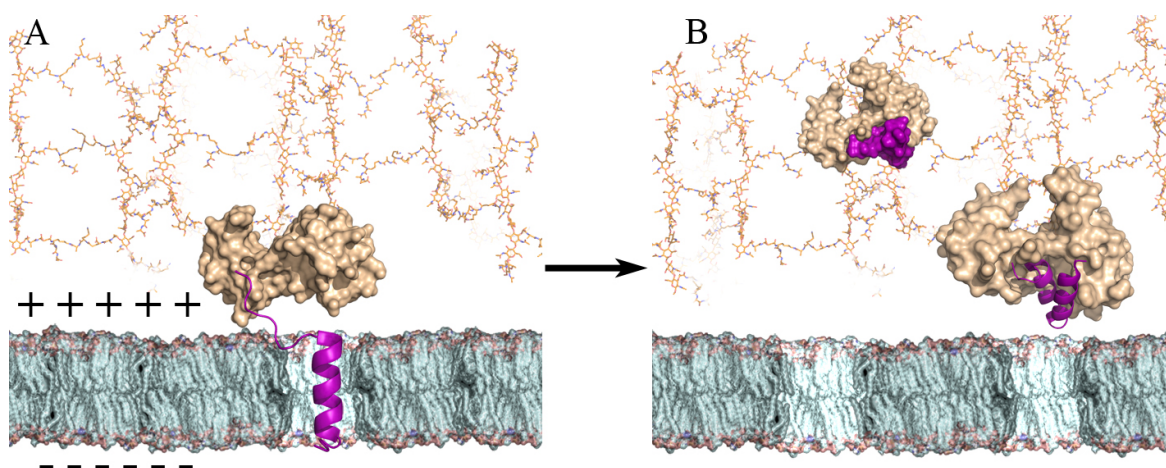


Figura 1.9. Mecanismo de inserción-liberación de endolisinas con el dominio SAR. (A) Las lisinas en su forma enzimáticamente inactiva se insertan en la membrana gracias al dominio SAR (hélice magenta). (B) La liberación se sucede con la disrupción del potencial protón motriz de la membrana, esta liberación permite la adopción de la forma soluble y activa de la endolisina en la región periplasmática accediendo al peptidoglicano.

Otras lisinas poseen señales de secreción en el N-terminal que intervienen en su transporte a la membrana, este último mediado por el sistema secretor del hospedador. Una vez translocadas a la membrana citoplasmática como zimógenos, las lisinas son posteriormente activadas gracias a la disrupción y despolarización de la membrana causada por las holinas, lo que deriva en una lisis celular inmediata (figura 1.9). Este sistema ampliamente estudiado en los fagos P21 y P1 (ambos de la familia del fago lambda), depende de un dominio denominado SAR (del inglés *Signal Arrest-Release*) (Young *et al.*, 2000; Gründling *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005). El dominio SAR es una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos, rica en residuos pequeños e hidrofóbicos (Ala, Val, Ile, Gly y Leu principalmente), y capaz de insertarse en la membrana plasmática manteniendo anclada la endolisina en su forma inactiva. La

liberación del dominio SAR permite el acceso de la lisina a la pared y la adopción de una conformación soluble (activa). Además, este dominio confiere a la endolisina una ubicación dual (a partes iguales generalmente) en la membrana y el periplasma (Xu *et al.*, 2005). Esta capacidad diferencia sustancialmente al dominio SAR, de diversas señales y dominios de unión a membrana, que en general son procesados (digeridos) para la liberación de zimógenos membranales (São-José *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2005).

La liberación de la endolisina desde la membrana (anclada por el dominio SAR) puede ocurrir de forma espontánea (independiente de la concentración de enzima), como demuestran los experimentos de expresión en plásmidos de bajo número de copias (Xu *et al.*, 2004). A pesar de ello, es la despolarización de la membrana, mediada por las holinas, lo que desplaza el equilibrio del sistema desencadenando una liberación masiva y la consecuente lisis celular. Así, las holinas siguen participando en el control del reloj biológico de la lisis al determinar el momento de la escisión, por causa del desajuste en la fuerza protón-motriz. Por otra parte se ha demostrado que la expresión del gen R^{21} (endolisina del fago P21), en fagos no lisogénicos como lambda, y la supresión del producto de S^{21} (holina del fago P21) puede causar la lisis celular aunque con un retraso considerable. Esto demuestra que la liberación y activación espontánea de las lisinas con dominio SAR, aunque lenta, es suficiente para matar a las células (Xu *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007).

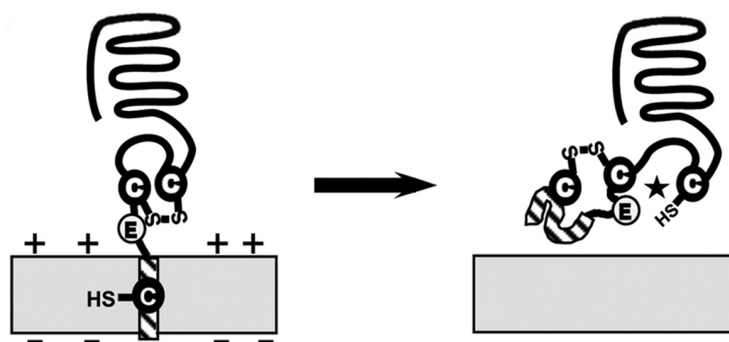


Figura 1.10. Esquema de isomerización de puentes disulfuro en el mecanismo de liberación y activación enzimática de Lyz^{P1} . La Cys^{13} que forma parte estructural del dominio SAR, se encuentra embebida en la membrana plasmática en la conformación inactiva de la enzima, mientras que las cisteínas 44 y 51 (esta última es el residuo catalítico) forman un puente disulfuro en el dominio soluble de la proteína. Luego de la liberación del dominio SAR, se produce la isomerización del puente disulfuro $\text{Cys}^{44}\text{-Cys}^{51}$ por $\text{Cys}^{44}\text{-Cys}^{13}$ dejando libre el residuo catalítico Cys^{51} . Figura tomada y modificada de Xu *et al.* (2005).

El mecanismo de activación ha sido determinado bioquímicamente y confirmado estructuralmente en Lyz^{P1} (lisina del fago P1) (Xu *et al.*, 2005). Una vez desequilibrado el potencial eléctrico de la membrana, que induce la liberación de la lisina, se suceden cambios conformacionales mediados por la isomerización de puentes disulfuros (figura 1.10). En éstos participa la Cys^{13} que forma parte estructural del dominio SAR y durante la conformación inactiva de la enzima, se encuentra embebida en la membrana plasmática en un estado oxidado. El residuo catalítico Cys^{51} forma un enlace disulfuro en el dominio expuesto a la región periplásmica con la Cys^{44} . La liberación desde la membrana induce la ruptura del enlace disulfuro $\text{Cys}^{51}\text{-Cys}^{44}$, lo que libera el residuo catalítico Cys^{51} y permite la formación un nuevo enlace entre la Cys^{13} (que se encontraba embebida en la membrana) y la Cys^{44} recién liberada del enlace disulfuro.

De esta forma, el dominio SAR participa en dos eventos, por un lado en la translocación e inserción de Lyz^{P1} a la membrana plasmática y, por otro, en la isomerización de los enlaces disulfuros, que permiten a la enzima adoptar su conformación activa tras la liberación del residuo catalítico (Xu *et al.*, 2005).

Al parecer, no todas las lisozimas con motivos SAR comparten este sistema de activación ya que, algunas como R^{21} (del fago P21), no poseen cisteínas que cumplan la función de isomerización de enlaces (Sun *et al.*, 2009). En estas lisinas el residuo catalítico equivalente a la Cys^{51} (generalmente un ácido aspártico) se encuentra muy cerca o inclusive forman parte del motivo de inserción a membrana. Esto sugiere una regulación de su actividad mediada por el impedimento estérico que causa la cercanía a la membrana. De hecho en R^{21} , la separación entre el sitio activo putativo y la secuencia SAR apenas se reduce a 10 aminoácidos, lo que fortalece la hipótesis de una interacción íntima entre ambos dominios (Park *et al.*, 2007). Las recientes estructuras de iR^{21} (inactiva, con la delección del dominio SAR) y aR^{21} (activa, y soluble) reveló una serie de cambios conformacionales que incluyen el reposicionamiento del ácido catalítico en el sitio activo, en la conformación soluble y activa de la enzima (Sun *et al.*, 2009).

Nuevas investigaciones comienzan a dilucidar mecanismos de lisis totalmente independientes de holinas (Morita *et al.*, 2001; Stojcovic & Rothman-Denes, 2007). Algunas endolisinas como la del fago de *Bacillus amyloliquefaciens* incluyen además un novedoso mecanismo de translocación similar al dominio SAR (Morita *et al.*, 2001). Este mecanismo podría compartir con los dominios SAR una homología estructural y funcional (hélices capaces de insertarse y liberarse de la membrana de forma espontánea), mas no son similares en secuencia. El análisis bactericida de esta endolisina mostró una importante capacidad de lisar bacterias Gram-negativas *in vitro*, lo que implica la necesaria unión a la membrana externa y la posterior liberación para acceder a la pared bacteriana. Los resultados mostraron, además, que al truncar el dominio de unión o translocación a la membrana (formado por hélices de baja hidrofobicidad) se perdía la actividad bactericida, pero no la actividad enzimática. A raíz de estos resultados se concluyó una probable interacción con la membrana externa de células bacterianas Gram-negativas (mediada por el novedoso dominio), necesaria para acceder al peptidoglicano y finalmente destruir la pared (Morita *et al.*, 2001).

Estudios recientes de otra endolisina, Gp61 codificada por el colifago N4, permitieron además definir una nueva familia de mureín hidrolasas (GH108) que comparten la posible independencia de holinas y la ausencia de dominios SAR clásicos (al menos por homología de secuencia) (Stojcovic & Rothman-Denes, 2007). Sin embargo, Gp61 posee un pequeño dominio en el N-terminal que le permiten a la enzima asociarse y liberarse de la membrana plasmática; lo que indica en principio una analogía funcional con los dominios SAR. Además este nuevo dominio parece estar íntimamente ligado a la conformación del sitio activo, hecho aún por demostrar desde una perspectiva estructural (Stojcovic & Rothman-Denes, 2007).

1.9. GP61, UNA NUEVA FAMILIA DE MUREÍN HIDROLASAS

1.9.1. Características generales de Gp61

Gp61 es una *N*-acetilmuramidasa (EC 3.2.1.17) de 23 kDa (208 residuos) codificada por el genoma del fago N4 de *E. coli*. Esta *N*-acetilmuramidasa es

responsable de la lisis bacteriana durante la fase final del ciclo de vida del fago, permitiendo la liberación de la progenie. Esta lisina carece de una homología significativa con otras mureín hidrolasas previamente caracterizadas, de fagos y bacterias, que cumplen las mismas funciones. Además este ORF61 (*Open Reading Frame* 61) de N4, codifica una mureín hidrolasa con un dominio putativo de unión a membrana (residuos del 7 al 29) y un dominio de unión a PG (residuos del 118 al 157) con una alta homología a diversos dominios de la superfamilia PG_binding_3. Este gen posee, además, homología con otra serie de ORFs de bacterias y fagos (figura 1.11) y comparte, al margen de la similitud en secuencia, la carencia de una señal N-terminal de translocación a membrana que pueda ser reconocida y procesada por el sistema de translocación del hospedador.

El trabajo de Stojkovic & Rothman-Denes (2007) que analizó bioquímica y genéticamente a Gp61, permitió definir una nueva familia de glicosil hidrolasas, denominada GH108, que incluye hasta el momento 146 genes bacterianos y 6 genes de virus. La mayoría de las características moleculares del mecanismo de lisis y translocación a membrana de esta familia son aún materia de estudio.

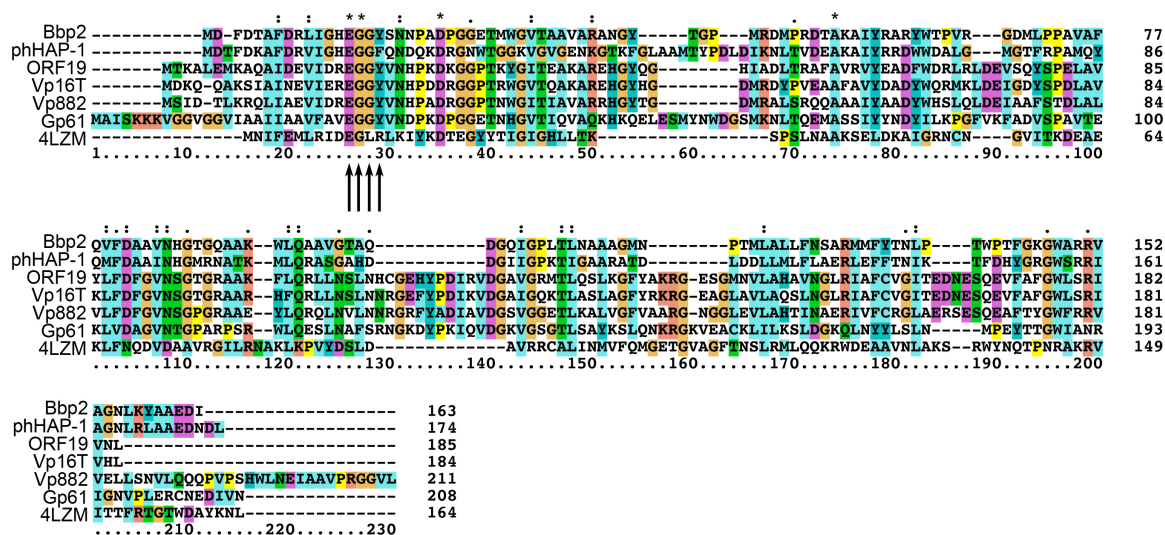


Figura 1.11. Alineamiento de secuencias de lisinas hipotéticas de diversos virus, que comparten homología con Gp61. Las flechas indican las cuatro posiciones de secuencia conservada EGGY. La descripción de las secuencias representadas es la siguiente (entre paréntesis los números de acceso a la base de datos del NCBI): Bbp-2, proveniente del fago BPP-1 de *Bordetella* sp. (AAR97669.1); PhiHAP-1, proteína hipotética del fago PhiHAP-1 de *Halomonas* sp. (ABY90413.1); ORF19, marco de lectura abierta del fago VHML de *Vibrio harveyi* (AAN12317.1); VP16T, proteína hipotética del fago de *Vibrio parahaemolyticus* VP16T (AAQ96493.1); VP882, proteína putativa conservada del fago VP882 de *Vibrio* sp. (ABM73431.1); Gp61, lisina del bacteriófago N4 de *E. coli*; 4LZM, lisozima de *E. coli*. Los puntos (.) y el asterisco (*) en la parte superior indican los residuos mejor conservados de las secuencias en orden ascendente respectivamente.

1.9.2. Mecanismo catalítico de lisis

En general, las lisinas dependen de una pareja o una tríada de residuos catalíticos para romper los enlaces glicosídicos (Fischetti, 2008). En esta pareja (o tríada, dependiendo de la familia) uno funciona como donador de protones (un residuo ácido),

y otro como aceptor (un residuo nucleofílico/básico).

Dependiendo de la posición espacial de los residuos catalíticos, la reacción ocurre por un sistema de retención o inversión de la configuración anomérica, aunque esta característica no ha sido determinada en el mecanismo de Gp61. Los estudios de mutaciones específicas y la comparación con sus homólogos, desvelaron resultados muy interesantes que indican la posible presencia un mecanismo con complejos cambios conformacionales involucrados con la unión y liberación de la membrana.

El Glu26 presente en la secuencia N-terminal EGGY, conservada en la familia como lo indica el alineamiento de la figura 1.11, probablemente funciona como donador de protones (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007). Mutaciones del mismo conllevan a la pérdida de la actividad hidrolasa. Además este es el único ácido glutámico con un alto grado de conservación en la familia; lo que aumenta la probabilidad de su relación con la catálisis. Sin embargo, esto no ha sido comprobado estructuralmente.

Por otra parte, el Glu26 podría estar estructuralmente relacionado con el dominio putativo de unión a membrana. Los estudios quiméricos, que incluyen intercambios del dominio N-terminal (de unión a membrana) entre proteínas pertenecientes a la familia GH108, indican que la presencia del dominio es imprescindible para la hidrólisis. Aún no se han definido el resto de los residuos catalíticos y tampoco las implicaciones del dominio N-terminal en este proceso. Esto probablemente dependerá de la determinación estructural y el correspondiente análisis funcional de Gp61.

1.9.3. Ubicación subcelular: la hélice transmembrana

La ubicación subcelular de Gp61 es otra de las características particulares de esta enzima, que posee una distribución eminentemente membranal (entre 85-90%); diferenciándola de la distribución dual de las lisinas con dominio SAR (50% membrana/periplasma). Se ha comprobado que la fracción restante (entre 10-15%), que se encuentra en la región periplásmica, no es suficiente para causar la lisis celular de forma inmediata. Lo que implica la necesaria translocación de una gran parte de la enzima inactiva (anclada a la membrana). Al parecer esta proteína se asocia a la membrana hasta el momento, genética y fisiológicamente controlado, en que es necesaria la ruptura de la pared. A diferencia de la mayoría de las lisinas estudiadas, la activación del proceso de lisis derivado de la escisión de la Gp61 de la membrana, parece no depender de holinas, ya que no se han encontrado genes homólogos a estas proteínas en el operón de lisis de la fase tardía del ciclo de vida del fago N4 (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007).

La asociación a la membrana de Gp61 depende de la secuencia N-terminal que comprende desde el aminoácido 7 hasta el 29. Parte de esta secuencia es una probable hélice alfa transmembrana. Este tipo de hélices comparten características comunes a lo largo del espectro evolutivo, y en el caso de hélices que se anclan de forma permanente a la membrana, su principal característica es un altísimo grado de hidrofobicidad causado por la presencia de aminoácidos voluminosos e hidrofóbicos (principalmente aromáticos) (Nyholm *et al.*, 2007). Por su parte, las hélices con asociaciones frágiles pueden comprender comportamientos anfipáticos o hidrofóbicos débiles que permitan asociarse y disociarse de la membrana por cambios conformacionales que conllevan un requerimiento energético relativamente bajo. La energía necesaria para los cambios puede suministrarse por procesos enzimáticos o fisiológicos asociados al estado de carga y potencial protón motriz de la membrana (Wallin *et al.*, 1998; Nyholm *et al.*,

2007; Voet & Voet, 2007; Sun *et al.*, 2009). Además su secuencia se caracteriza por aminoácidos de pequeño volumen y un comportamiento hidrofóbico débil (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007).

De forma interesante este dominio no sufre una hidrólisis posterior a la translocación, lo que implica que la forma soluble y activa de la enzima mantiene el dominio. Así, este dominio formando parte estructural de la proteína soluble y activa, parece ser imprescindible en la actividad catalítica de la misma. La implicación del dominio N-terminal en ambas facetas (translocación e hidrólisis) y la presencia del Glu26 como parte del mismo, plantea la necesidad de cambios estructurales importantes que le permitan cumplir con ambos cometidos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

La pared bacteriana continúa siendo la diana por excelencia de las terapias clínicas basadas en el uso de antibióticos. Este trabajo de investigación comprende la caracterización estructural de dos proteínas (AmpD y Gp61) involucradas en el mismo contexto biológico, la fisiología de la pared bacteriana, aunque cada una de ellas, desempeña una función distinta asociada a su origen y contexto fisiológico específico. Ambas proteínas representan temas de investigación relevantes, en la búsqueda de alternativas para la lucha contra la creciente selección activa de resistencias a los antibióticos, en diversas bacterias de gran importancia en la salud pública. Por un lado AmpD, una amidasa citosólica de *C. freundii* que forma parte del sistema de reciclaje de la pared bacteriana, y es un punto clave en la regulación de la expresión de β -lactamasas, y por otro, Gp61, una lisina codificada por el bacteriófago N4 de *E. coli*, responsable de la degradación de la pared bacteriana para la liberación de la progenie.

En la actualidad, se requiere de un entendimiento integral de la fisiología de la pared bacteriana que permita seguir explotando su potencial. Para entender la importancia de las características particulares de AmpD y desvelar las razones moleculares de las actuales incongruencias entre la información estructural y bioquímica, se plantearon los siguientes objetivos generales:

1. Determinación estructural de AmpD por cristalografía de rayos X.
2. Identificación y caracterización de las bases estructurales del reconocimiento al sustrato (muropéptidos).
3. Caracterizar estructuralmente el mecanismo de hidrólisis de AmpD.

La investigación de los enzibióticos, enzimas con capacidad bactericida, como terapia alternativa al uso de antibióticos, crece de forma interesante en la medida en que se suman resultados positivos en los últimos años. Gp61 representaría un enzibiótico notable, cuyas características distintivas podrían ser de gran utilidad en terapias novedosas. Para desvelar y comprender las características particulares de esta enzima se plantearon los siguientes objetivos generales:

1. Determinación estructural de Gp61 por cristalografía de rayos X.
2. Caracterización del mecanismo de translocación a membrana, y su relación con la regulación de su actividad.
3. Caracterización molecular del mecanismo de hidrólisis de Gp61

3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.1. CRISTALOGRAFÍA DE MACROMOLÉCULAS: UNA VISIÓN GENERAL DEL PROCESO

Desde principios del siglo XX, y gracias al descubrimiento de los rayos X, la Cristalografía ha permitido la resolución de problemas estructurales de la materia ordenada, lo que conocemos con el nombre de cristales, y hoy continúa siendo la técnica física más potente en la determinación de las estructuras tridimensionales a nivel atómico. La Cristalografía ha contribuido con un 87% del total de las estructuras de proteínas depositadas hasta la fecha en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, del inglés *Protein Data Bank*), y su aportación anual es aún exponencial. La gran importancia de esta técnica radica en que posibilita el estudio de las estructuras tridimensionales de las proteínas, extrayendo información muy precisa a nivel atómico, plegamiento de las cadenas peptídicas, distancias interatómicas, ángulos de enlace y vibración térmica de los átomos entre otros, incluyendo el empaquetamiento molecular en el cristal. Además, es una disciplina que permite abarcar desde sistemas de bajo peso molecular, como pequeños péptidos, hasta otros muy complejos que involucran interacciones entre moléculas de diversas características y orígenes (Hermoso & Martínez-Ripoll, 2003). La figura 3.1 resume de manera esquemática las etapas concretas del proceso de resolución estructural de una proteína mediante Cristalografía de rayos X.

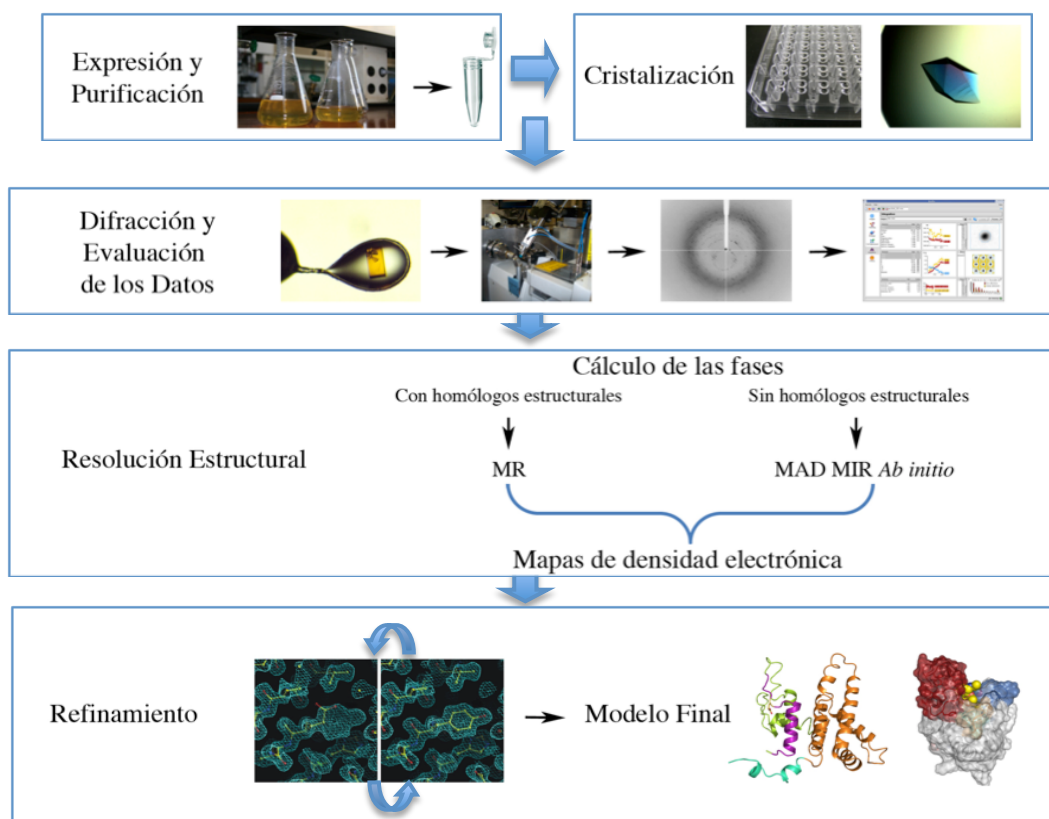


Figura 3.1. Esquema global del proceso de resolución estructural de una proteína por Cristalografía de rayos X. Las etapas concretas del proceso han sido señaladas en cada una de las secciones enmarcadas en los recuadros.

3.2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS DEL PROCESO METODOLÓGICO

3.2.1. Introducción. La biología molecular al servicio de la Cristalografía

La biología estructural demanda cuantiosas cantidades de proteína con un alto grado de pureza (mayor del 90%) y homogeneidad, condiciones necesarias para iniciar el proceso de cristalización. Estos requerimientos iniciales, y las características complejas de la fisiología celular, que funciona como fuente del material, son evidentemente opuestos, y así, el proceso de extracción y purificación del material biológico no es necesariamente una fase sencilla. Sin embargo el avance tecnológico de los sistemas de expresión heterólogos, principalmente en *E. coli*, han convertido la producción y purificación de proteínas solubles en algo habitual, evadiendo o resolviendo problemas comunes (agregados proteicos, cuerpos de inclusión, desnaturalización y proteólisis entre otros) que de otra forma afectarían la obtención de proteínas en su conformación nativa y funcionalmente activa, es decir, con todas las características esenciales que la Cristalografía demanda.

La producción de proteínas comprende muchas etapas que exigen una gran experiencia en bioquímica y biología molecular. A continuación se resumen los grandes avances en ingeniería genética y de proteínas, que también han hecho posible el despegue exponencial de la biología estructural y que han sido utilizados en este trabajo experimental.

- a. Clonación y expresión de proteínas en sistemas heterólogos. La ingeniería genética en bacterias permite resolver el problema de la cantidad de proteína necesaria para los ensayos de cristalización, a través de varias tecnologías concretas. Entre ellas, sistemas de clonaje rápidos, controlables, sencillos y reproducibles que han evolucionado desde mediados de los años 80. La utilización de *E. coli* para expresar genes provenientes de distintos organismos (revisado por Harris & Emtage, 1986), con cepas diseñadas y seleccionadas para tal fin; plásmidos con diversas funciones y la inclusión de promotores de alta afinidad provenientes de fagos (plásmidos de expresión derivados de pET28), e incluso sistemas de maximización del crecimiento bacteriano, y expresión de proteínas, como los medios de autoinducción (Studier, 2005), han permitido en conjunto aumentar el rendimiento proteico por litro de cultivo.
- b. Purificación. Es un pre-requisito esencial en la Cristalografía, debido a que los grados de pureza y homogeneidad de la muestra proteica condicionan los avances en el proceso de cristalización. Los principios de la purificación dependen de las características físico-químicas de la proteína y el medio biológico del que se extrae. Por ello, es esencial toda la información bioquímica referente a la proteína objeto de estudio y sus contaminantes (otras proteínas y/o moléculas diversas). Podemos destacar como información inicial fundamental el peso molecular, el punto isoelectrico, la actividad y secuencia génica y peptídica, entre otros. Los sistemas básicos para la purificación incluyen la ruptura de las células de forma enzimática y/o mecánica, separación por centrifugación (diferencial, isopícnica, zonal y ultracentrifugación), precipitaciones y permeabilizaciones selectivas, además de diversas cromatografías (intercambio catiónico/aniónico, exclusión molecular o afinidad) (Stryer *et al.*, 2007; Voet & Voet, 2008). El aumento de la eficiencia de los sistema de purificación a través de la utilización del proceso más corto, y de ser posible también el más barato,

es uno de los objetivos subyacentes en las estrategias de purificación (Canalias-Reverter & Valle-Abellán, 2003). Por tanto el tiempo en el que una muestra es sometida a este proceso es un factor determinante. Así, la duración de una purificación es directamente proporcional a la probabilidad de degradación, desestabilización o desnaturalización de la muestra, y en este sentido la evolución de sistemas de purificación rápidos, en un solo paso cromatográfico, ha representado un avance significativo en el aumento de la eficiencia del proceso (Voet & Voet, 2008). La afinidad natural de ciertos motivos peptídicos por metales como Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} o Cu^{2+} ha sido explotada por la ingeniería genética. De tal manera que secuencias de poli-histidinas son insertadas en cualquiera de los extremos de las proteínas blanco, permitiendo, generalmente, separarlas en un solo paso por cromatografías de afinidad a metales (Hochuli *et al.*, 1988; Janknecht *et al.*, 1991).

3.2.2. Cristalización, punto crucial de la biología estructural

La consecución de monocristales con el tamaño y la calidad adecuados para someterlos a difracción de rayos X, es el primer paso en la determinación de la estructura tridimensional de una proteína (McPherson, 1989). A diferencia de los cristales de sales, o de compuestos orgánicos simples, la obtención de cristales de proteína es un proceso generalmente difícil debido, entre otros aspectos, a la heterogeneidad natural de las macromoléculas, característica opuesta al vital principio de uniformidad necesario para la formación de un cristal. Además, la complejidad del proceso de cristalización de una proteína dificulta la predictibilidad del mismo a partir de los datos físico-químicos de la muestra, ya que la formación de interacciones proteína-proteína y proteína-solvente en los cristales, son procesos netamente estocásticos, muy difíciles de modelar con la precisión necesaria para entender todas las contribuciones puntuales a la energía libre del proceso de cristalización. No obstante, estas dificultades no impiden la aplicación de una metodología racional y sistemática para obtener una cristalización exitosa (Rupp, 2010).

3.2.2.1. Los cristales de proteína

Un cristal se define como una red imaginaria en la que se repiten unidades idénticas (la celdilla unidad) formando un espacio simétrico que puede explicarse por una función de traslación aplicada a lo largo de los denominados ejes, estructurando de esta manera el volumen total del cristal. A su vez, la celdilla contiene una unidad simétricamente irreductible, la unidad asimétrica. La aplicación sobre la unidad asimétrica de todos los elementos de simetría que describen al cristal, define el contenido total de la celdilla (figura 3.2 A). De esta forma la celdilla unidad se compone de tres ejes (a , b , c) y tres ángulos interaxiales (α , β , γ) que constituyen el sistema de referencia de las coordenadas atómicas (figura 3.2 B). La combinación de la celdilla unidad y los elementos de simetría definen el Grupo Espacial, que finalmente describe el patrón por el cual la unidad asimétrica reproduce el empaquetamiento cristalino. En el caso de las proteínas, su quiralidad condiciona que el empaquetamiento cristalino se describa sólo en uno de los 65 Grupos Espaciales no centrosimétricos, de los 230 posibles.

En contraste con los cristales de sales (o de moléculas orgánicas simples), las moléculas de proteína se empaquetan con una baja densidad y poseen un volumen de

celdilla relativamente grande. Las diferencias en las propiedades físico-químicas de ambos tipos de cristales residen en varios aspectos. Por un lado, en proporción a la gran masa molecular de las proteínas, el número de enlaces no covalentes (puentes salinos, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) que mantienen el ensamblaje de la red cristalina es muy bajo (McPherson, 2004). Además, contienen un elevado volumen de solvente desordenado (entre el 50 y 80%) distribuido en amplios canales internos (Matthews, 1968; McPherson, 2004). Por todo ello, sus espectros de difracción están constituidos por un gran número de reflexiones (en cada imagen) que exhiben una baja intensidad promedio. Sin embargo, estos vastos espacios internos del entramado cristalino y la presencia de una amplia esfera de solvatación, confieren verosimilitud fisiológica al plegamiento y conformación de las proteínas cristalizadas, y a su vez posibilitan la inclusión de ligandos, átomos pesados o moléculas diversas con fines metodológicos y/o biológicamente funcionales (Rupp, 2010). En muchos casos, una amplia variedad de moléculas, cationes, iones metálicos, ácidos orgánicos, etc., que forman parte de la solución de cristalización o proteica, pueden interactuar con la superficie de las proteínas e incluso facilitar el empaquetamiento (Trakhanov *et al.*, 1998; McPherson, 2001; McPherson & Cudney, 2006).

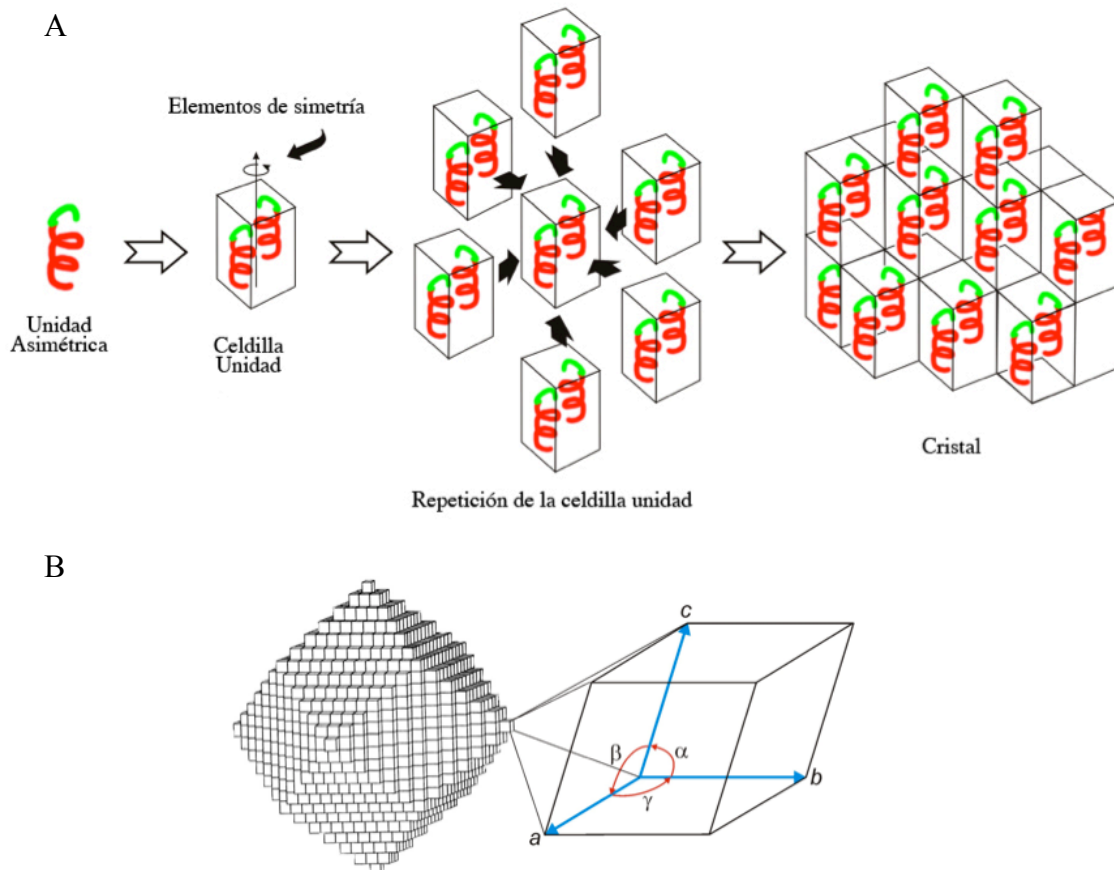


Figura 3.2. Concepto de unidad asimétrica y celdilla unidad. (A) La unidad asimétrica (figura del extremo izquierdo) se repite dentro de la celdilla (figura central) al aplicar los elementos de simetría (en este caso un eje helicoidal), a su vez la celdilla elemental se repite conformando el cristal por efecto de las traslaciones en las tres direcciones del espacio. (B) La celdilla unidad cuyo apilamiento genera el volumen total del cristal, también define el sistema de referencia para las coordenadas atómicas. Ambas figuras fueron tomadas y modificadas de Pérez-Dorado (2008) y de Hermoso & Martínez-Ripoll (2003).

En resumen, aunque las características morfológicas pueden ser equivalentes, existen diferencias importantes entre los cristales de compuestos de bajo peso molecular (sales, moléculas inorgánicas y orgánicas) y los cristales de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, virus). Los primeros se caracterizan por fuertes interacciones en la red cristalina, alto orden interno, en general dureza física, poca susceptibilidad ante la deshidratación, fácil manipulación, propiedades ópticas fuertes (polarización de la luz visible) y difracción intensa de los rayos X. En comparación, los cristales de macromoléculas son mucho más limitados en tamaño, poseen interacciones débiles en el enrejado, se resquebrajan fácilmente, son sensibles a la deshidratación por exposición al aire, poseen propiedades ópticas débiles y difractan pobremente los rayos X en la mayoría de los casos (McPherson, 2004). Por tanto, las aproximaciones metodológicas de la resolución estructural de macromoléculas por rayos X también difieren.

3.2.2.2. Principios y métodos de la cristalización de proteínas

Se distinguen dos etapas concretas en el proceso de cristalización. La formación de los primeros agregados ordenados que sirven como origen del cristal (nucleación) condicionando la morfología del mismo, y la etapa de crecimiento en el que las fuerzas de atracción entre las moléculas son máximas (Kam *et al.*, 1978; Saridakis & Chayen, 2000; Benvenuti & Mangani, 2007; Rupp, 2010). Presumiblemente la nucleación ocurre a través de la formación de intermediarios parcialmente ordenados en solución (intermediarios paracristalinos) que finalmente se asocian, lo que conlleva a la formación de núcleos críticos (ensamblajes completamente ordenados). Sin embargo, este fenómeno aún se encuentra vagamente caracterizado desde el punto de vista teórico. El crecimiento cristalino por otro lado, está mejor caracterizado (crecimiento por dislocación, crecimiento por nucleación bidimensional y en menor grado por nucleación tridimensional) (Malkin *et al.*, 1995; McPherson *et al.*, 1995).

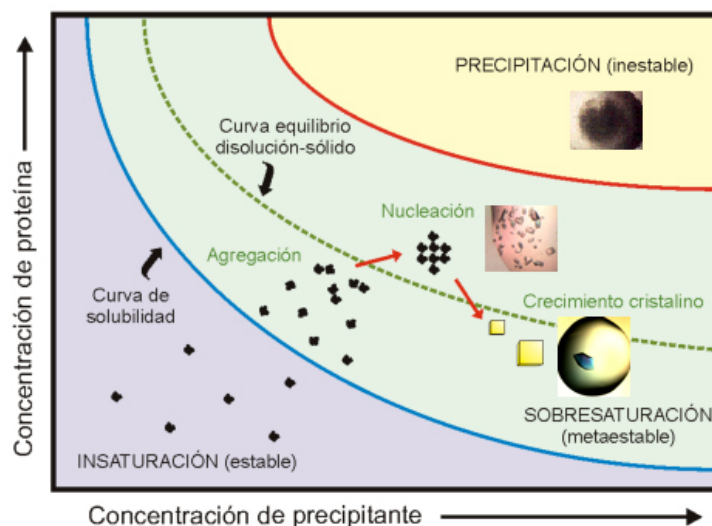


Figura 3.3. Diagrama bidimensional de solubilidad de una proteína (diagrama de fases). La representación de la solubilidad de una proteína respecto de su concentración (eje de las ordenadas) y la concentración de precipitante (eje de las abscisas), permite estudiar el comportamiento general de la cristalización, a través de las diversas fases explicadas en la sección 3.2.2.2.

Para formar un cristal de proteína, las moléculas deben separarse de la solución y auto-ensamblar una red periódica (Rupp, 2010). Por tanto, metodológicamente, las proteínas deben ser conducidas a una situación cuyo estado energético más bajo sea la organización periódica, un trabajo arduo e improbable desde el punto de vista termodinámico. Para ello se empieza con soluciones de proteínas concentradas del orden de algunos mg/ml, a las cuales se les añaden soluciones que reducen la solubilidad de las mismas (precipitante). Excedido el límite de solubilidad de la proteína, la solución se vuelve sobresaturada y termodinámicamente metaestable. En este punto, si se dan las condiciones favorables para la formación de núcleos iniciales (proceso de nucleación), los cristales pueden empezar a crecer en tiempos razonablemente cortos (figura 3.3) (Saridakis & Chayen, 2000). Se entiende entonces, que para el crecimiento de un cristal se precisa alcanzar una fase de sobresaturación, de tal forma que el equilibrio del sistema sea restablecido por el desarrollo de un estado “sólido” (los cristales) (McPherson, 2004).

Desde un punto de vista práctico, son varios los factores que pueden ser modificados para generar un estado de sobresaturación (tabla 3.0). Sin embargo, si el soluto sobrepasa considerablemente el punto de saturación, la situación dejará de ser metaestable para convertirse en inestable (figura 3.3), razón por la cual se pueden formar muchos núcleos y una gran cantidad de microcristales. Además, una superación abrupta de este punto, por exceso de velocidad, tiende a generar precipitados o agregados amorfos, los cuales son inadecuados para los experimentos de difracción (Rubio, 2003). Entonces, es necesario alcanzar la sobresaturación a la velocidad adecuada y superar someramente la frontera de lo metaestable, en la dirección de lo inestable, para conseguir los resultados esperados.

Tabla 3.0. Métodos para crear la sobresaturación

1. Mezclado directo para crear inmediatamente la sobresaturación a través del método de Batch
2. Alterar la temperatura del sistema
3. Alterar la concentración de sales
4. Alterar el pH
5. Añadir ligandos específicos que alteren la solubilidad de la macromolécula
6. Alterar el estado dieléctrico del medio
7. Extraer agua del sistema de forma directa (evaporación)
8. Añadir un polímero que genere exclusión de volumen
9. Adición de un agente con capacidad de crear puentes entre moléculas (“bridging agent”)
10. Concentración de la macromolécula
11. Eliminación de los agentes que mantienen la solubilidad del sistema
12. Añadir solventes orgánicos (volátiles y no volátiles)

De todos los métodos de cristalización existentes (difusión de vapor, contradifusión, diálisis o a través de interfases), la difusión de vapor es el más generalizado (Salemme, 1972; Chayen, 1997; Benvenuti y Mangani, 2007). Éste consiste en mezclar (comúnmente a partes iguales) en una gota, la solución de proteína con soluciones de cristalización. La gota resultante se dispone en un sistema cerrado

que se equilibra frente a un reservorio de la misma solución de cristalización. La gota (proteína y precipitante), que puede dispensarse de forma colgante o sentada (figura 3.4), no está en contacto directo con el reservorio. De esta forma la fase de vapor entre ambos permite el intercambio, por diferencia de concentración, de los componentes volátiles (esencialmente agua) de las soluciones (figura 3.4). Este sistema produce un aumento de la concentración de la macromolécula en la gota y un acercamiento progresivo a la condición de sobresaturación, hasta que la cinética del sistema alcanza el equilibrio.

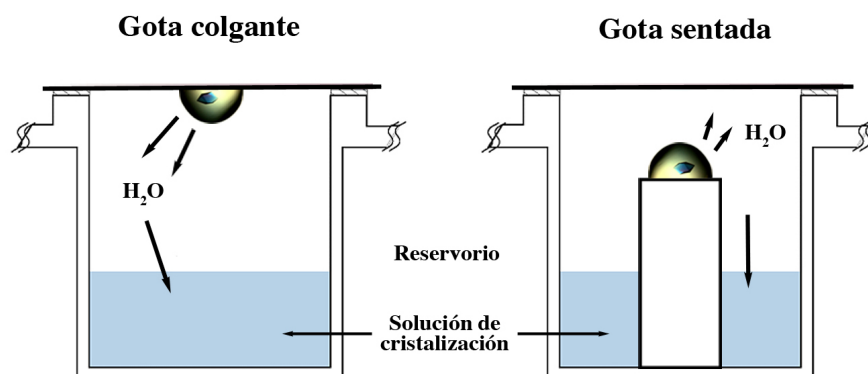


Figura 3.4. Cristalización mediante el método de difusión de vapor. En el caso de la gota colgante el sistema se sella, generalmente con el uso de grasa, mientras que en la gota sentada se utiliza cinta adhesiva transparente. En ambos casos el principio de intercambio de vapor, a través de la fase gaseosa, entre la gota (menos concentrada en solutos) y el reservorio (más concentrado) se mantiene al cerrar herméticamente el sistema.

Complejos de proteína-ligando

Existen dos métodos para la obtención de complejos de proteína-ligando, la inmersión (*soaking*) y la cocrystalización (Hassell *et al.*, 2007). Estas dos técnicas han sido empleadas en este trabajo y a continuación se describen brevemente.

- Cocrystalización. Este método es posible aplicarlo con ligandos pequeños y también de gran tamaño. Consiste en la cristalización de la proteína en presencia del ligando. La mezcla de ambos puede hacerse directamente en la gota o con una previa incubación. Además, permite una amplia variación en su aplicación; por una lado, se puede utilizar en las condiciones en las que la proteína cristalizó de forma previa, sin la presencia del ligando; o en caso de que el ligando afecte el empaquetamiento del cristal o la cinética del sistema, se pueden barrer también todas las condiciones iniciales de cristalización.

- Inmersión. Este método se encuentra limitado normalmente a moléculas de tamaños relativamente pequeños debido a la baja tasa de difusión en los cristales, dependiente del diámetro de los canales internos del cristal. Consiste en la inmersión de los cristales de proteína obtenidos, en soluciones con ligando que deben mantener las características físico-químicas de la condición de cristalización. Esta técnica presenta inconvenientes que pueden dificultar e incluso impedir la obtención del complejo, y entre los más importantes se encuentran la necesidad de que la región de interacción con el ligando sea accesible y que la unión de éste no afecte al empaquetamiento de forma excesiva.

3.2.2.3. Búsqueda de las condiciones de cristalización

Antes de iniciar el proceso de cristalización se debe contar con una muestra de proteína en las mejores condiciones posibles:

- **Una concentración elevada**, preferiblemente superior a los 10 mg/ml; aunque concentraciones menores no son indicativo directo de resultados menos exitosos.
- **El mayor grado de pureza posible**, superior al 95%, ya que las impurezas pueden limitar el tamaño y calidad de los cristales. De igual forma, siendo la cristalización una forma de purificación, en casos excepcionales un menor grado de pureza no necesariamente impedirá alcanzar los objetivos.
- **Una alta homogeneidad**. La heterogeneidad de las proteínas es un factor intrínseco. Se debe evitar incluir además otras fuentes de heterogeneidad derivadas de los procesos de obtención de la muestra.
- **Una alta estabilidad**, evitando así los problemas de desnaturalización, agregación y precipitación. Aunque la estabilidad limitada siempre y cuando no comprenda problemas de precipitación y/o agregación tampoco es un obstáculo limitante para iniciar el procedimiento de búsqueda de condiciones.
- **Suficiente cantidad disponible**, que permita realizar la búsqueda de condiciones iniciales y su posterior optimización.

La exploración de las condiciones de cristalización es, al menos en su inicio, necesariamente empírica. Inicialmente se carece de la información que permita utilizar, *a priori*, condiciones que derivarán en el alcance de la fase de sobresaturación a la velocidad adecuada para la cristalización. Además, el número de variables involucradas en el proceso es muy amplio, lo que dificulta enormemente la capacidad de sistematizar la exploración inicial de todos los factores. Por ello, el proceso de cristalización se lleva a cabo en dos pasos. Primero se realiza un barrido amplio con condiciones iniciales a partir de matrices que son resultado de la acumulación de experiencias exitosas (Jancarik & Kim, 1991; Gilliland *et al.*, 1994), y en segundo lugar, una optimización sistemática de dichas condiciones (Benvenuti & Mangani, 2007).

Para la primera aproximación, la búsqueda inicial, se cuenta actualmente con robots de cristalización que permiten maximizar el rendimiento, a través de la reducción del volumen de proteína que se puede utilizar y de una disminución importante del tiempo de trabajo. De esta forma se maximiza el número de experimentos posibles. También se dispone de una batería de soluciones comerciales que intentan abarcar el mayor número de combinaciones de variables. Dichas baterías están basadas en la constante ampliación del compendio de conocimiento al respecto, e incluso en sistematizaciones puntuales de factores que han demostrado ser de vital importancia en la cristalización (agente precipitante, pH y tipo de tampón y aditivos) (Jancarik & Kim, 1991; Brzozowski & Walton, 2001).

Una vez obtenidos los resultados iniciales positivos, que pueden variar desde la obtención de cristales de altísima calidad hasta microcristales o precipitados cristalinos susceptibles de mejoras (Bergfors, 1999), se inicia el proceso sistemático de optimización de las principales variables:

- **Agente precipitante.** Generalmente polímeros de distintos tamaños moleculares (como el polietilenglicol) y en menor grado compuestos orgánicos volátiles. Se varía la concentración y en muchos casos incluso el tipo de precipitante; se realizan variaciones metódicas alrededor de la concentración de partida.
- **pH.** Además del pH se varía, si es necesario, la naturaleza del tampón. Generalmente se utiliza un rango de pH entre 4.0 y 8.5.
- **Aditivos.** Se varía también la naturaleza y concentración de los aditivos, sales, detergentes, alcoholes, ligandos específicos e iones metálicos entre otros, que son utilizados a bajas concentraciones.
- **Temperatura.** Aunque es un factor que tiende a dejarse de lado, la experiencia experimental indica que su variación puede suponer mejoras significativas en la calidad de los cristales. Se barren temperaturas entre 4 y 20°C.

3.2.3. Técnicas Cristalográficas

3.2.3.1. Difracción de los rayos X

Los rayos X son radiación electromagnética de alta energía. Tras su descubrimiento por W. Conrad Röntgen en 1896, fueron más tarde los investigadores Max Von Laue y la familia Bragg (Sir W. Henry y su hijo Sir W. Lawrence) quienes establecieron el comportamiento de los rayos X como ondas electromagnéticas. El fenómeno de la difracción de los rayos X resulta de la interacción de dicha radiación con los electrones de los átomos de la materia ordenada. Cuando un haz de rayos X incide sobre un cristal, interactúa con los electrones de los átomos que lo componen, haciéndolos vibrar acopladamente con las variaciones periódicas de su campo eléctrico y produciendo un fenómeno de dispersión (normalmente elástica), que finalmente emite una nueva radiación en forma esférica (Hermoso & Martínez-Ripoll, 2003; Rupp, 2010). Los rayos X emitidos son dispersados en todas las direcciones del espacio y muchos de ellos se anulan por un proceso de interferencia destructiva. Sin embargo, la regularidad y periodicidad de la construcción cristalina favorece, en determinadas direcciones, un proceso de combinación y refuerzo cooperativo para dar lugar a la difracción.

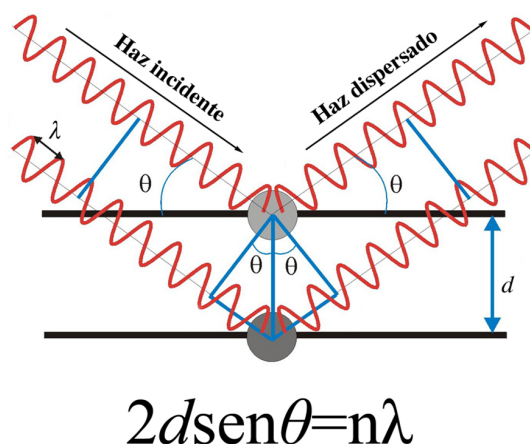


Figura 3.5. Ley de Bragg. La onda que incide en el plano inferior se retrasa un número entero de longitudes de onda y es dispersada en fase con la onda inferior, reforzándose la señal. Imagen tomada y modificada de Hermoso & Martínez-Ripoll (2003).

Este fenómeno fue interpretado por William Lawrence Bragg en 1912, estableciendo la hipótesis de que la difracción de los rayos X por parte de los cristales, ocurre en forma de “reflexión” originada por unos planos virtuales de la red cristalina. La reflexión (difracción) se produciría entre planos paralelos distanciados por el valor d con un ángulo de incidencia θ , de tal manera que la diferencia del camino recorrido por dos trenes de onda sea igual a un múltiplo entero de la longitud de onda λ (figura 3.5) (Hermoso & Martínez-Ripoll, 2003; Giacovazzo, 2011). Cada familia de planos que cumpla la ley de Bragg producirá una reflexión resultante; el conjunto de estas reflexiones (y por lo tanto los planos) puede modelarse en forma de una nueva red virtual, que recibe el nombre de espacio recíproco. El modelo de Ewald (figura 3.6), da una interpretación del proceso de toma de los datos de difracción y establece que al girar un cristal que se encuentra sometido a un haz de rayos X en una dirección fija, la difracción ocurrirá cuando los puntos de la red recíproca (anteriormente las familias de planos) intersece la superficie de la denominada esfera virtual de Ewald.

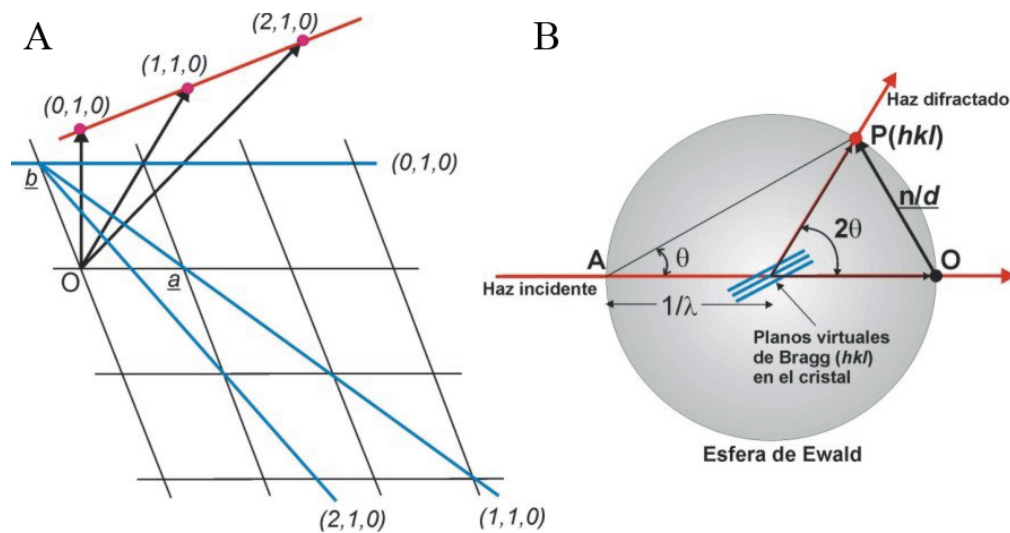


Figura 3.6. (A) Construcción de la red recíproca a partir de las familias de planos de Bragg. (B) Interpretación de la difracción según el modelo de Ewald. Figura tomada y modificada de Hermoso & Martínez-Ripoll (2003).

3.2.3.2. Medida del espectro de difracción

Los rayos X son utilizados experimentalmente para determinar las estructuras atómicas, ya que las longitudes de onda que los componen poseen frecuencias del mismo orden de magnitud de las distancias entre los focos dispersores; y este requerimiento es esencial en el fenómeno de la difracción.

Para medir el espectro de difracción, los cristales son irradiados con un haz monocromático de rayos X de alta energía, o rayos X duros, con una longitud de onda del orden de 1 \AA . Durante el experimento la dirección del haz de energía es fija y se varía la posición angular del cristal para registrar en los detectores el mayor número de reflexiones posibles del espacio recíproco (*red recíproca*). Por tanto el experimento de difracción requiere de un equipamiento sofisticado constituido por:

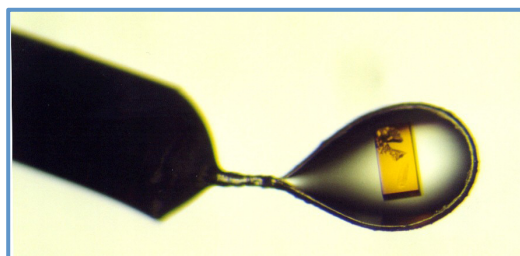
- **Fuente de rayos X** que genere el haz de rayos X monocromático. En este trabajo fue utilizada la radiación X producida en un sincrotrón, cuyas características y ventajas serán resumidas en la sección 3.2.3.3, y en un generador de ánodo rotatorio.
- **Sistema de detección** que recoja la información de las reflexiones difractadas por el cristal y las digitalice en imágenes que luego serán procesadas.
- **Sistema de oscilación del cristal** que permita exponer las diversas direcciones del cristal, y por tanto de la *red recíproca*, con movimientos angulares controlables.
- **Sistema criogénico** que mantenga el cristal a una baja temperatura (alrededor de 100K). Esto es debido a que los rayos X duros son radiación ionizante y además de generar calor en la muestra, produce que los electrones de alta energía se desprendan de las capas internas de los átomos, reaccionando e interactuando con otros átomos, rompiendo enlaces y generando radicales libres que causan un daño por radiación severo a las proteínas y por tanto al orden del cristal. Así, la baja temperatura disminuye estas consecuencias.

Las fuentes de rayos X usadas en la cristalografía son básicamente de dos tipos, una de ánodo rotatorio (o del tipo de tubo sellado) y otra procedente de una fuente de radiación sincrotrón. En este trabajo, para la resolución estructural de las proteínas AmpD (incluyendo complejos con los productos de la reacción, holoenzima y apoenzima) y Gp61 se utilizó la radiación X producida en un sincrotrón.

3.2.3.2.1. Preparación de la muestra cristalina

Como se mencionó anteriormente, la incidencia de la radiación X sobre los cristales de proteína, produce daños en la capacidad de difracción del cristal (Blake & Phillips, 1962; Sliz *et al.*, 2003). A partir de los estudios de Hope (1988), la toma de datos se lleva a cabo rutinariamente a una temperatura de entre 100 y 120K, utilizando sistemas de flujo laminar de nitrógeno gaseoso, que mantienen la muestra vitrificada. A esta temperatura se reduce enormemente el daño causado por la radiación. Para vitrificar la muestra es necesario que el agua del sistema no forme hielo, el cual además de difractar, entorpeciendo la calidad de los datos, puede destruir el empaquetamiento cristalino. Este problema se resuelve utilizando soluciones crioprotectoras, durante el proceso de montaje, que deben ser escogidas cuidadosamente según las características de la solución de cristalización ya que, en algunos casos, pueden dañar la integridad del cristal (Garman & Mitchell, 1996; Robinson *et al.*, 2000). El sistema de montaje comprende un lazo de nylon que no interfiere con la difracción y se utiliza para manipular los cristales, extraerlos de la gota, sumergirlos en diversas soluciones y finalmente posicionarlos en el goniómetro (figura 3.7).

Figura 3.7. Cristal montado en un lazo de nylon. Este sistema se utiliza para extraer y manipular el cristal en las gotas, y realizar las inmersiones en crioprotectores o ligandos. También para colocar el cristal en el goniómetro que permite la realización de los movimientos angulares durante los experimentos de difracción.



3.2.3.3. Fuentes de radiación, la radiación sincrotrón

La radiación sincrotrón es generada por aceleradores de partículas (electrones o positrones) hasta velocidades relativistas (cercanas a la velocidad de luz) en canales rectilíneos, que forman quebradas en anillos de hasta cientos de metros de perímetro (figura 3.8). Cuando estas partículas son forzadas a cambiar la dirección de su trayectoria por imanes, se emite una radiación electromagnética tangencial a la dirección de las partículas aceleradas (figura 3.9). Esta radiación es muy energética y comprende un amplio espectro continuo de longitudes de onda, entre ellas los rayos X.

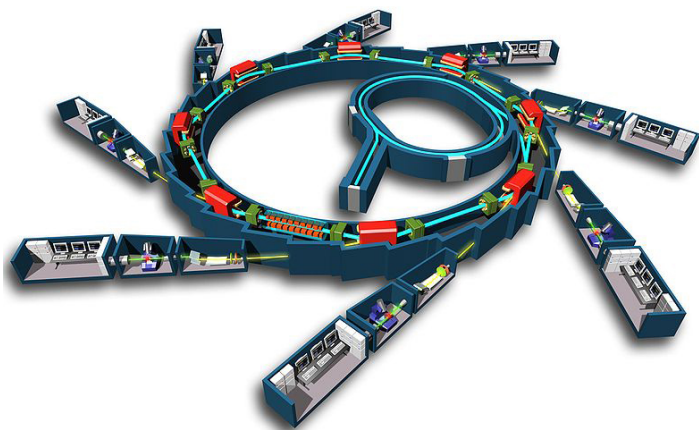


Figura 3.8. Esquema general de un sincrotrón. Las partículas que salen del inyector son aceleradas inicialmente en un dispositivo toroidal en la parte interna del sincrotrón; posteriormente pasan al anillo externo y son almacenadas circulando a velocidades relativistas. A partir de ese anillo, se disponen las distintas estaciones de trabajo, las cuales a pesar de su gran diversidad metodológica cuentan con el mismo patrón de construcción, que incluye, la cabina óptica, cabina de experimentos y la cabina de control y análisis de los experimentos.

La radiación sincrotrón presenta ventajas significativas frente a los generadores convencionales de ánodos rotatorios, aunque estos últimos representan un sistema de gran versatilidad y bajo coste. Por un lado, el mayor brillo (radiación más intensa y concentrada), que además puede focalizarse en áreas microscópicas aumentando así su intensidad, permite solventar los problemas de la baja capacidad de difracción asociada a los cristales de proteína y sacar provecho de microcristales que no podrían ser utilizados con fuentes de radiación menos poderosas. En segundo lugar, también es posible sintonizar la longitud de onda, lo que permite, como se verá más adelante, abordar el problema fundamental del cálculo de las fases con técnicas como la dispersión anómala.

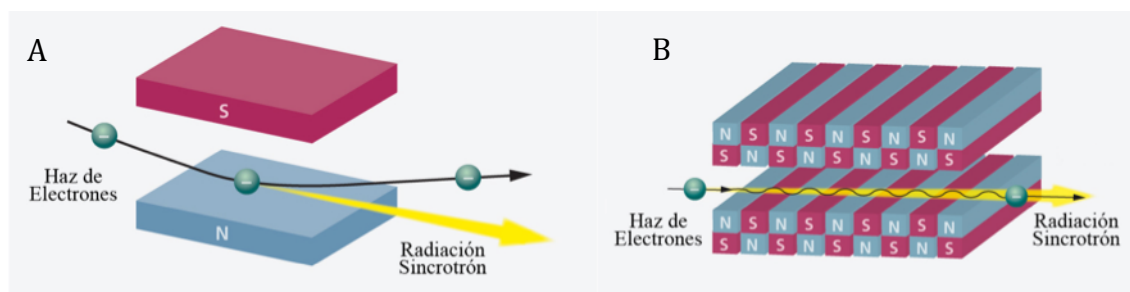


Figura 3.9. Sistemas de imanes para la aceleración y redireccionamiento de las partículas en un sincrotrón. (A) Los imanes de curvatura (bending magnet) desvían los electrones rápidos haciendo que emitan radiación en forma tangencial. (B) Los onduladores denominados también “dispositivos de inserción”, son precisamente insertados entre dos imanes de curvatura. Estos fuerzan a los electrones a seguir una ruta ondulada, produciendo una luz excepcionalmente brillante. Figuras tomadas y modificadas de <http://www.psi.ch/>.

3.2.3.4. Procesado de los datos de difracción

Los datos generados en un experimento de difracción son imágenes digitales. La radiación difractada por los cristales es recopilada por detectores, y la información es almacenada como un conjunto de datos que comprende imágenes sucesivas, cada una de ellas correspondiente a intervalos angulares (normalmente entre 0.2° y 1°) definidos durante el experimento y que en suma comprenden el total de la exposición angular a la que fue sometido el cristal. La posición relativa de los distintos haces difractados permite extraer la información de la celdilla, mientras que el análisis de las ausencias sistemáticas de ciertas intensidades, da información sobre el Grupo Espacial. El procesamiento de los datos comprende varios pasos progresivos.

Indexado e Integración. Se determinan los parámetros de la celdilla y se calculan sus dimensiones y topología. En esta etapa también se obtiene la medida de las intensidades y una predicción de los Grupos Espaciales más probables, escogiéndose el que mejor se ajuste para continuar el procesamiento de los datos.

Escalado. Se corrigen las intensidades tomando en cuenta varios factores, entre los que se encuentran el ruido de fondo de la imagen, la mosaicidad del cristal, el decaimiento de la difracción del cristal a lo largo del tiempo de exposición, y las posibles fluctuaciones de la fuente de rayos X. Posteriormente se realiza un promediado de las intensidades, escalados a todos los datos. Las intensidades promediadas y corregidas son reducidas a la denominada unidad asimétrica del espacio recíproco. En este momento se puede analizar cuantitativamente la calidad general de los datos en base a los criterios siguientes:

- **R_{sym} .** Indica las diferencias (porcentuales) de las intensidades de las reflexiones relacionadas por simetría. Los valores globales de R_{sym} para un buen conjunto de datos deben ser menores del 10%.
- **$I/\sigma(I)$.** Representa la razón de la intensidad de la señal respecto del ruido. Son aceptables valores por encima de 2 para el promedio de esta división, en las distintas capas o conchas de resolución (ángulos de difracción).
- **Multiplicidad o redundancia.** Representa el número de veces que se ha medido la misma reflexión (o sus equivalentes por simetría) a lo largo del conjunto de datos. Cuanto mayor sea su valor, mejor será la estimación de los errores asociados a la medida de la reflexión.
- **Compleitud.** Indica el porcentaje del espacio recíproco que ha sido medido. La completitud global debe ser de un 90-100%, y de al menos un 80% en la última capa de resolución.

Cálculo del módulo del factor de estructura. El factor de estructura es la onda resultante del haz difractado por todos los átomos de la celdilla en una determinada dirección. Como cualquier onda, el factor de estructura viene caracterizado por su módulo, $|F(hkl)|$ y su fase $\phi(hkl)$. El módulo representa la amplitud del haz difractado y puede calcularse directamente a partir de la intensidad medida para dicha reflexión. En cambio, la fase no puede medirse durante el proceso de difracción, aunque puede ser estimada, de forma indirecta, a través de varios métodos.

3.2.4. Resolución Estructural, el problema de las fases

La transformación de la información del espacio recíproco (espectro de difracción) al espacio cristalino (posición de los átomos), implica la solución de la función de densidad electrónica $\rho(xyz)$, mediante una transformada de Fourier (ecuación 3.1). En esta función, que representa la envolvente electrónica de los átomos dentro del cristal, intervienen los *factores de estructura* $F(hkl)$ (ecuación 3.2), definidos en cada punto del espacio recíproco y que, como se ha dicho, pueden ser descritos por sus módulos, $|F(hkl)|$ y fases, $\phi(hkl)$, respecto de un origen común. La expresión analítica del factor de estructura se muestra en la ecuación 3.2. y en ella se incluye el factor de dispersión (*scattering*) atómico f_j , que da cuenta de la dispersión de los rayos X provocada por todos los electrones del átomo j . Sin embargo las intensidades no aportan información sobre las fases $\phi(hkl)$, las cuales no pueden ser medidas experimentalmente. Este hecho se denomina en cristalografía el *problema de las fases*, y de allí la necesidad de recurrir a distintos métodos para determinarlas (Hermoso & Martínez-Ripoll, 2003; Giacovazzo, 2011).

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V_c} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \cos 2\pi [hx + ky + lz - \phi(hkl)]$$

Ecuación 3.1. Función de densidad electrónica definida en cada punto de la celdilla elemental cristalina de coordenadas x,y,z . Esta ecuación representa la *transformada de Fourier* entre el espacio cristalino, definido por $\rho(xyz)$, y el espacio recíproco, definido por los factores de estructura $F(hkl)$. Es importante resaltar el hecho de que la densidad electrónica en un punto dado viene determinada por la información contenida en todos los factores de estructura, es decir, por la información de todo el espectro. De forma inversa, el valor de un factor de estructura (módulo y fase) está determinado por las posiciones de todos los átomos que forman la estructura, $\rho(xyz)$.

$$F(hkl) = \sum_j f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

Ecuación 3.2. El factor de estructura $F(hkl)$ es la resultante de la dispersión de todos los átomos de la celdilla. El factor f_j es el denominado factor de *scattering* (dispersión) atómico y es la resultante de la dispersión de todos los electrones del átomo para una determinada dirección de difracción.

Una vez obtenidas, mediante alguna estrategia, las fases asociadas a cada factor de estructura se puede resolver la ecuación 3.1, el cual proporciona un mapa de la densidad electrónica en cada punto de la celdilla elemental, y por tanto, la estructura tridimensional.

Mientras el *problema de las fases* para cristales de moléculas pequeñas ha sido resuelto por *métodos directos*, en el caso de los cristales de proteínas se puede solventar mediante varios métodos: (i) **Reemplazo Molecular (MR)** del inglés *Molecular Replacement*, haciendo uso de un modelo de una proteína homóloga de estructura conocida, (ii) **Reemplazo Múltiple Isomorfo (MIR)**, del inglés, *Multiple Isomorphous*

Replacement), a través de la introducción de átomos altamente dispersores, (iii) **Dispersión Anómala Simple o Múltiple (SAD, del inglés *Single-wavelength Anomalous Diffraction* o MAD, del inglés *Multi-wavelength Anomalous Diffraction*)** que se basa en la utilización de átomos dispersores anómalos; y aunque menos frecuentemente por métodos (iv) ***Ab initio*** cuyas aplicaciones se mantienen en una constante evolución. Todos estos métodos proporcionan información para calcular fases iniciales $\phi_c(hkl)$, que junto con las amplitudes, permiten calcular una función de densidad electrónica aproximada, sobre la cual se puede construir un modelo estructural aproximado, mejorable (Hermoso & Martínez-Ripoll, 2003). El proceso general se describe en la figura 3.10. En la resolución estructural de las proteínas involucradas en este trabajo se utilizaron los métodos de **MAD** y **MR**.

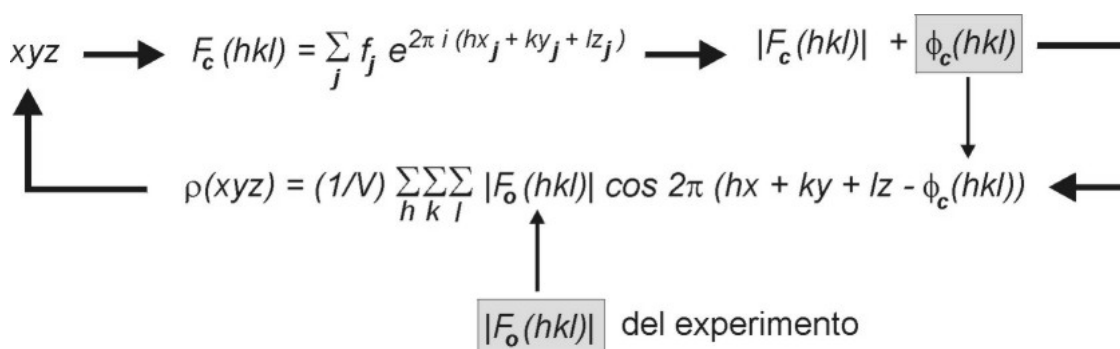


Figura 3.10. Esquema del cálculo de un mapa de densidad electrónica, $\rho(xyz)$. A partir de las posiciones atómicas conocidas (xyz) se pueden obtener los módulos de los factores de estructura, $|F_c(hkl)|$, y fases calculadas, $\phi_c(hkl)$. La función de densidad electrónica se calcula entonces con los módulos experimentales, $|F_{exp}(hkl)|$, y las fases calculadas, $\phi_c(hkl)$. Figura tomada de Hermoso y Martínez-Ripoll (2003).

3.2.4.1. Métodos de dispersión anómala y Reemplazo Molecular para la resolución del problema de las fases

3.2.4.1.1. Breve introducción a la dispersión anómala

Es bien conocido que los electrones se encuentran unidos al núcleo por fuerzas que dependen de la intensidad del campo atómico y del estado cuántico del electrón. Por esta razón son considerados osciladores con frecuencias naturales, y cuando se hace incidir una radiación X cuya frecuencia sea cercana a la frecuencia natural de oscilación de los electrones se produce un efecto de resonancia (Giacovazzo, 2011). La dispersión bajo estas condiciones es denominada anómala y puede ser analíticamente expresada por la sustitución del factor de *scattering* atómico f_j contenido en la ecuación 3.2 por un término complejo (ecuación 3.3).

$$f = f_a + \Delta f' + i f'' = f' + i f'' = |f| e^{i\delta}$$

Ecuación 3.3. Componentes del factor de *scattering* atómico. En presencia de dispersión anómala, el factor de *scattering*, f_a , es modificado por los términos real, $\Delta f'$, e imaginario, $i f''$, de la fracción anómala del factor de *scattering*.

Como se muestra en la figura 3.11 para el caso del cobre (Cu), las variaciones de $\Delta f'$ (f') e if'' (f'') frente a la energía de los rayos X se pueden calcular utilizando aproximaciones teóricas. En aquellos valores de la energía de rayos X donde se encuentra el fenómeno de resonancia, y por tanto *dispersión anómala*, los valores de f' aumentan considerablemente, mientras que los de f'' decrecen. Este hecho es de gran importancia ya que muchos átomos pesados usados en cristalografía, poseen picos de absorción a energías (longitudes de onda) que se pueden alcanzar fácilmente mediante radiación sincrotrónica. De esta forma se obtienen datos con una componente normal (debida a los átomos ligeros de la proteína), y una componente anómala (debida a los átomos pesados) que producen una alteración en la fase global de cada reflexión. Como consecuencia los *pares de Friedel* (parejas de reflexiones que en condiciones normales deberían tener la misma amplitud y fases, pero con signo opuesto), muestran una variación en los valores de sus intensidades. Esta diferencia cuantificable, la *difracción anómala*, proporciona información acerca de las fases generadas por los dispersores anómalos, como una primera aproximación a las fases globales (Hermoso & Martínez-Ripoll, 2003).

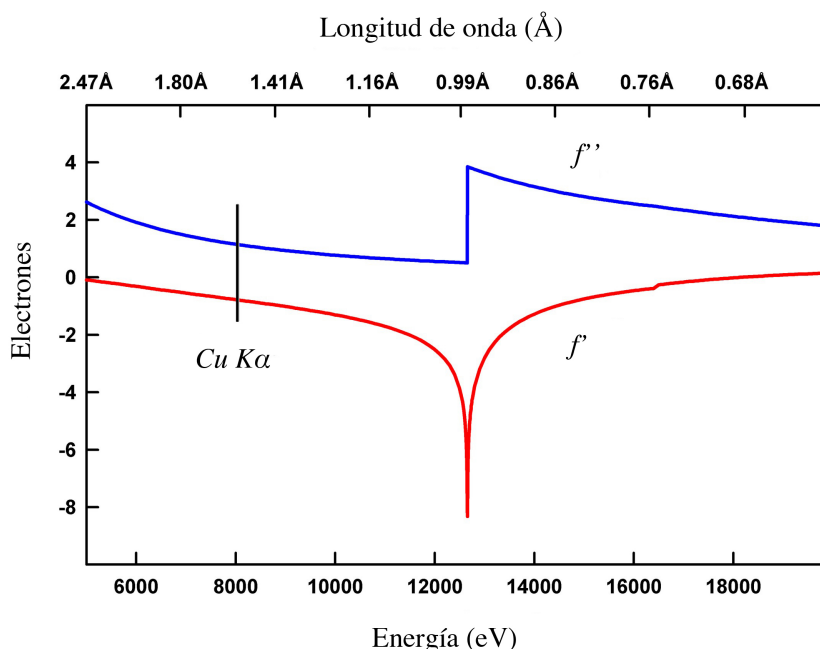


Figura 3.11. Variación de las componentes real e imaginaria del factor de dispersión atómico del selenio en función de la energía de los rayos X incidentes. La línea vertical señala la longitud de onda del Cu K α . Figura tomada de Hermoso & Martínez-Ripoll (2003).

3.2.4.1.2. Métodos de dispersión anómala, MAD y SAD

El método de MAD, a día de hoy el más utilizado para el cálculo de las fases *de novo*, emplea los datos de difracción recogidos a varias energías en torno a la región de la línea de absorción del dispersor anómalo (Hendrickson, 1985; Hendrickson, 1999). Estos experimentos son posibles gracias a la utilización de la radiación sincrotrón cuyas longitudes de onda son sintonizables. Los datos se recogen a las energías que maximizan f'' (el pico), el que minimizan f' (punto de inflexión), y otra lejana a estos dos, denominada remota. Al combinar estos datos y analizar la diferencia entre ellos, es posible calcular la distribución de amplitudes y fases generadas por los dispersores anómalos, como una primera aproximación a las fases globales, permitiendo determinar

la densidad electrónica para toda la proteína. La gran ventaja de este método es que proporciona datos de fase de muy buena calidad y resuelve, casi de forma directa y experimental la ambigüedad de la solución de las fases.

Para el método de SAD, los datos son recogidos a una sola longitud de onda en la región en donde el factor de dispersión atómica presenta una parte imaginaria elevada (preferiblemente máxima, aunque no necesariamente). La solución de la fase con este método es ambigua, a pesar de que dicha ambigüedad puede ser parcialmente salvada a través de la utilización de métodos de mejora de la fase, como la modificación de densidad, y la utilización de la simetría no cristalográfica. Los métodos de dispersión anómala en conjunto presentan una gran ventaja respecto de los métodos MIR, ya que no tienen que cumplir la condición de isomorfismo entre los diferentes cristales (con átomo pesado y sin él). Esto se debe a que los conjuntos de datos de ambos tipos de experimentos (MAD y SAD), pueden en principio, y es lo habitual, ser obtenidos a partir de un único cristal. Sin embargo, demandan medidas de las intensidades de difracción muy precisas como consecuencia de la relativa debilidad de las diferencias anómalas. El SAD presenta además la ventaja, respecto del MAD, de necesitar un conjunto único de datos (pero con muy alta redundancia) lo que disminuye el tiempo de exposición global a los rayos X, evitando posibles problemas relacionados con el daño por radiación. Este hecho es muy importante debido a la miniaturización progresiva de las técnicas de la cristalografía, que permite utilizar cristales cada vez más pequeños y fuentes de radiación más potentes. Desde el punto de vista práctico, la recogida de datos de un cristal comienza intentando garantizar, al menos, un buen conjunto de datos en el pico de absorción del dispersor anómalo, para luego continuar con el punto de inflexión y el remoto, lo que permite, en caso de no alcanzar los datos necesarios para la aplicación del MAD, obtener datos para emplear el método de SAD.

En general, en la aplicación experimental no es necesario introducir átomos aislados en los cristales de proteína como dispersores anómalos. La biología molecular permite sustituir, en las proteínas recombinantes, las metioninas o las cisteínas por residuos de selenio-metionina o selenio-cisteína (Cowie & Cohen, 1957; Hendrickson *et al.*, 1990; Hermoso & Martínez-Ripoll, 2003; Strub *et al.*, 2003). El selenio es un dispersor anómalo adecuado que permite desarrollar los métodos de MAD/SAD y obtener fases en una proporción numérica aproximada de 100:1 (100 residuos por cada átomo de selenio) (Hendrickson, 1999).

3.2.4.1.3. El Reemplazo Molecular (MR)

Para resolver el *problema de las fases* se puede hacer uso de un modelo de una proteína homóloga en su secuencia primaria (preferiblemente por encima del 30%) y de estructura conocida; esta metodología se conoce como **Reemplazo Molecular (MR)** (Rossmann, 1972; Machin, 1985; Navaza, 1994). La base de esta metodología radica en el hecho de que la similitud en el plegamiento proteico es muy superior a la similitud en su secuencia peptídica y por tanto proteínas homólogas tendrán un plegamiento muy parecido. Así, el modelo homólogo es utilizado experimentalmente como si de la proteína desconocida se tratase; de esta forma, se transfiere la estructura molecular del modelo desde su propio empaquetamiento cristalino hasta la situación en el cristal de la proteína desconocida. El posicionamiento de la molécula en la celdilla del cristal de la proteína cuya estructura es desconocida, requiere de la determinación de la orientación correcta, *función de rotación*, y la posición precisa, *función de traslación*, en el espacio (figura 3.12).

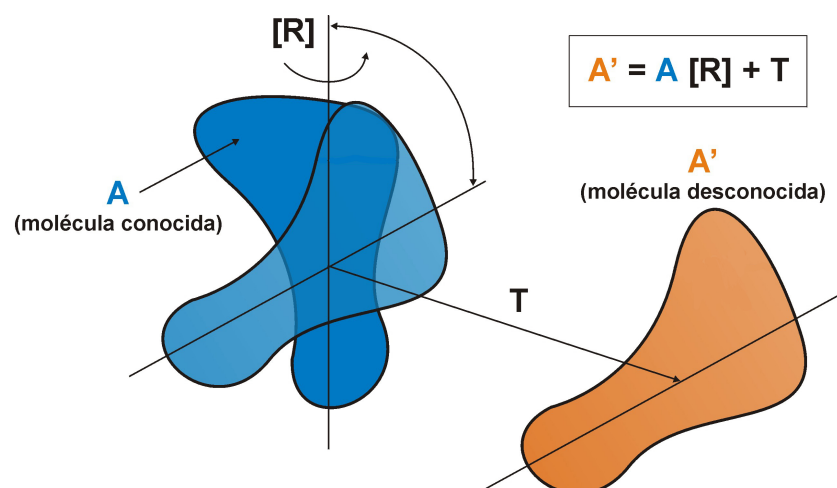


Figura 3.12. Proceso esquemático del reemplazo molecular (MR). La molécula de estructura conocida (A), en azul, se rota mediante la operación [R] y luego se traslada mediante la operación [T], para llevarla hasta la posición que ocupa la molécula desconocida (A'), en naranja, de acuerdo a su empaquetamiento particular en el cristal.

Las soluciones del reemplazo molecular deben de ser analizadas mediante la correlación entre las funciones de Patterson, que proporciona información exclusivamente sobre los vectores interatómicos y es equivalente a la ecuación 3.1 (eliminando las fases y utilizando los cuadrados de los módulos de $F(hkl)$ experimental y calculado con la proteína conocida). En este sentido, coeficientes de correlación altos, entre las mencionadas funciones de Patterson, indican un buen acuerdo entre el espectro de difracción experimental y el calculado. Una vez encontradas las funciones de rotación y traslación correctas (con mejor coeficiente) se resuelve la función de densidad electrónica utilizando los factores de estructura experimentales y las fases obtenidas a partir del modelo homólogo. El análisis final de los resultados requiere, en muchos casos, de un posterior trabajo manual de corrección y de un buen ejercicio de experiencia cristalográfica, además del refinamiento matemático del modelo frente a los datos experimentales para evitar los sesgos. Este método necesita de datos de difracción de un cristal nativo (sin derivados de metales pesados), lo que representa una ventaja práctica frente a los métodos de obtención de fases *de novo*.

3.2.4.3. Trazado de la cadena peptídica y refinamiento del modelo

La representación gráfica de los valores de la *función de densidad electrónica* (ecuación 3.1) genera el *mapa de densidad electrónica* cuya calidad dependerá de la exactitud y la resolución de los datos del espectro de difracción. Si la distribución de fases estimadas es correcta el mapa mostrará zonas de densidad electrónica positiva dentro de las cuales se ajusta el esqueleto peptídico (figura 3.13). Esta labor se realiza mediante programas gráficos y equipos informáticos que permiten, de modo interactivo, trazar la cadena polipeptídica ajustando carbonos α y cadenas laterales. Una vez ajustado gráficamente el modelo, ya sea, corrigiendo y ampliando un modelo previo (proveniente del reemplazo molecular) o construyendo uno nuevo (en el caso del “faseado” *de novo*), se introducen las herramientas matemáticas que permiten agilizar el proceso de convergencia entre el modelo estructural y las observaciones experimentales (Hermoso & Martínez-Ripoll, 2003).

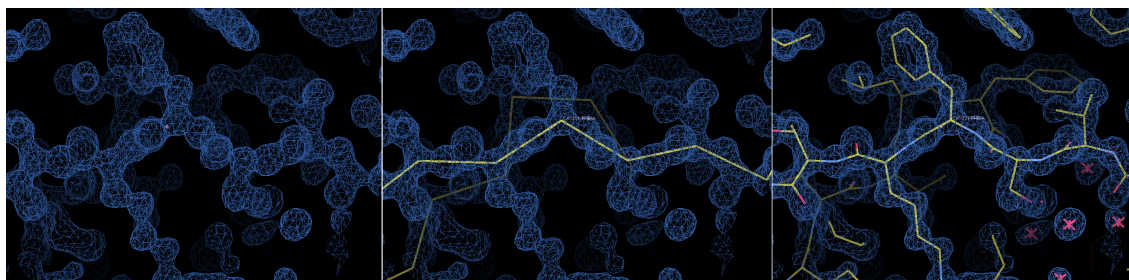


Figura 3.13. Mapas de densidad electrónica. La representación gráfica de la función de densidad permite, con la ayuda de programas gráficos, construir el modelo estructural de la proteína.

El refinamiento matemático, comúnmente denominado refinamiento estructural, permite corregir los parámetros atómicos que definen el modelo estructural, el cual ha sido ajustado a los mapas de densidad electrónica. Los parámetros a refinar son los siguientes:

- **Coordenadas atómicas (x, y, z).** Éstas determinan la posición de cada uno de los átomos dentro de la celdilla unidad.
- **Factores térmicos (B).** Representan la agitación térmica o movilidad de cada átomo.
- **Factores de ocupación.** Definen la fracción de celdillas en las que un mismo átomo ocupa una determinada posición.

Dado el elevado número de átomos que constituyen las moléculas de proteína, y que el número de observaciones debería ser proporcional al número de parámetros a refinar, se introducen una serie de restricciones geométricas (distancias y ángulos de enlace, torsiones) que son conocidas con gran precisión para el caso de los aminoácidos. Si la calidad del mapa responde a criterios mínimos, éste debe ser lo suficientemente predictivo para corregir incluso errores en la asignación de residuos en la secuencia primaria de la proteína.

El método de refinamiento utilizado depende necesariamente de cuan avanzado esté el modelo en esta etapa, es decir, en el primer momento se aplican refinamientos de *Cuerpo Rígido* (del inglés *Rigid Body*) y el algoritmo de *Templado Simulado* (del inglés *Simulated Annealing*), una adaptación del *Método de Montecarlo*. Este método se caracteriza por un “calentamiento” que permite movilizar la molécula de sus mínimos energéticos locales, y un posterior “enfriamiento” que aumenta la probabilidad de alcanzar un nuevo y menor mínimo energético global (Kirkpatrick *et al.*, 1983; Černý, 1985). En etapas posteriores, se utilizan los métodos probabilísticos de *Máxima Verosimilitud* (del inglés *Maximum Likelihood*), procedimiento habitualmente utilizado en estadística para el ajuste de modelos y estimación de parámetros, que fue analizado y popularizado por Fischer a principios del siglo XX (Aldrich, 1997).

Durante el proceso de refinamiento se debe asegurar que los cambios introducidos en el modelo, converjan finalmente hacia la estructura real del cristal (y por ende de la molécula). Para el seguimiento del ajuste se calcula un factor de desacuerdo R , que indica la bondad del modelo mediante el cálculo de las diferencias entre el espectro observado ($|F_{obs}|$) y el calculado a partir del modelo experimental ($|F_{cal}|$), según la ecuación 3.4.

$$R(\%) = \frac{\sum |F_{obs}| - \sum |F_{cal}|}{\sum |F_{obs}|} \times 100$$

Ecuación 3.4. Factor de desacuerdo R expresado de forma porcentual.

El factor R debe disminuir a lo largo del refinamiento, sin embargo un valor bajo no es obligatoriamente sinónimo de que el modelo se encuentre exento de sesgo. Así que, para asegurar que los cambios introducidos en el modelo son representativos de la estructura real, se utiliza una validación cruzada que se basa en el cálculo de un segundo factor de convergencia, el R_{free} . Este método implica la separación del total de reflexiones en dos conjuntos, uno que comprende el 90-95% de las reflexiones que son utilizadas para el refinamiento (*working set*) y otro, del 5-10%, que no son utilizadas en el refinamiento (*test set*). Finalmente el R_{free} mide el desacuerdo entre el modelo refinado y las reflexiones que no han sido utilizadas en el refinamiento; así, sólo los cambios que también disminuyan este último factor de desacuerdo serán correctos.

El refinamiento finaliza cuando el modelo, perfectamente ajustado al mapa de densidad electrónica, posee valores de R y R_{free} cercanos al 20% (y en todos los casos siempre por debajo del 30%). Tomando en cuenta que el R_{free} siempre posee valores superiores, con una diferencia que oscila alrededor del 5% y que depende de la calidad y la resolución de los datos (a mayor resolución, menor la diferencia entre los dos factores de desacuerdo). Posteriormente se realiza una validación del modelo que comprende una revisión general de distancias y ángulos de enlace, conformación de los rotámeros y ángulos de torsión, los cuales deben ajustarse, salvo casos excepcionales, a las restricciones estereoquímicas conocidas y ampliamente documentadas.

3.3 RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE AMPD

3.3.1. Síntesis de los sustratos de AmpD

Los compuestos **1**, **2**, **2a**, **3**, **4** y **5** (tablas 3.1 y 3.2 y figuras 1.4 y 3.14), sustratos y productos de AmpD, fueron suministrados por el Prof. Dr. Shahriar Mobashery de la Universidad de Notre Dame, Indiana (EEUU). La síntesis y purificación de los compuestos (figura 3.14, tablas 3.1 y 3.2) fue realizada según Hesek *et al.* (2009).

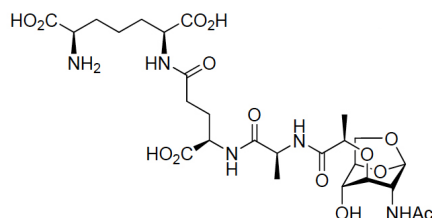


Figura 3.14. Substrato anhydMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP, compuesto **2**. Substrato de AmpD que fue utilizado en los ensayos de inmersión y con el cual se tuvo éxito en la obtención de complejos. Fórmula química, $C_{26}H_{41}N_5O_{14}$; peso molecular, 647.6 mg/mol.

La hidrólisis del compuesto **2**, el AnhMurNAc-tripéptido (figura 3.14), debida a la actividad de AmpD, produce los compuestos **3** (azúcar, anhMurNAc) y **4** (péptido, *L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP) (ver tabla 3.2). Por su parte el compuesto **1**, como se explicó en la introducción, es hidrolizado con una afinidad muy inferior a la del compuesto **2** por parte de AmpD.

3.3.2. Producción de AmpD y marcaje con selenio-metionina

La AmpD salvaje (holoenzima), el derivado de selenio-metionina (AmpD-SeMet) y la apoenzima (AmpD salvaje sin el ión de Zn) fueron suministradas por el Prof. Dr. Shahriar Mobashery de la Universidad de Notre Dame, Indiana (EEUU).

El gen *ampD* fue clonado desde el genoma de *Citrobacter freundii* e insertado en el vector de expresión pET24a(+) [pET24a(+)-*ampd*], bajo el promotor del fago T7 como describió anteriormente (Lee *et al.*, 2009). Para la producción de la AmpD-SeMet se utilizó la cepa de *E. coli* B834(DE3), auxotrófica para la metionina, que fue transformada con la construcción pET24a(+)-*ampd*. Inicialmente un preinoculo de 20 ml fue crecido a 37°C en medio mínimo M9 (Sambrook, 2001), suplementado con todos los aminoácidos esenciales para la cepa B834(DE3) de *E. coli*; este proceso permitió carenciar la masa celular. El preinóculo fue cosechado por centrifugación a 1000 g, y las células fueron posteriormente sembradas de forma equitativa en un total de 2 l (500 ml por erlenmeyer de 1 l) de medio mínimo M9 (sin metionina). Las bacterias fueron incubadas con agitación fuerte (200 rpm) a 37°C hasta alcanzar una absorbancia (D.O.₆₀₀) de 0.7 (aproximadamente unas 8-10 horas de incubación). Una vez alcanzado este valor de absorbancia, se agregó la selenio-*L*-metionina al cultivo y se procedió a inducir la sobreexpresión de AmpD con IPTG (400 μ M). Durante el proceso de sobreexpresión el cultivo fue incubado a 37°C en agitación fuerte (250 rpm) por un periodo de 12 horas. La purificación de AmpD-SeMet fue realizada de la misma forma que la AmpD salvaje (Lee *et al.*, 2009), y la incorporación de la selenio-metionina en la proteína pura fue corroborada por espectrofotometría de masas.

Durante el último paso de purificación, la AmpD salvaje (holoenzima) fue sometida a una columna de interacción hidrofóbica *Source* 15 ISO (2.5 cm \times 30 cm, 150 ml; Sigma). Para ello, el eluido del paso previo en tampón A (20 mM de fosfato pH 7.0 y 1 mM de ditiotreitól) fue llevado hasta una concentración de 2.4 M de (NH₄)₂SO₄. Posteriormente se aplicó un gradiente reverso de (NH₄)₂SO₄ (1.2 a 0 M) en tampón A. Durante este paso se observó la elución de dos picos correspondientes a AmpD (Lee *et al.*, 2009). Estos dos picos finalmente se diferenciaron en la presencia y ausencia de Zn²⁺ (Carrasco-López *et al.*, 2011). El pico correspondiente a la proteína sin Zn²⁺ fue separado y utilizado como apoenzima en los ensayos de cristalización.

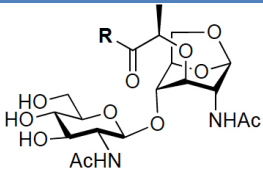
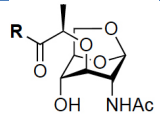
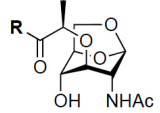
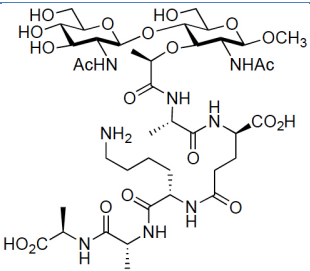
3.3.2.1. Estudios de actividad de AmpD

Los ensayos de actividad con la enzima pura fueron realizados en tampón fosfato 20 mM, pH 7.0 a 25°C, con concentraciones de sustratos que variaron entre 50 nM y 3.0 mM (ver tabla 3.2) y diversas concentraciones de enzima. Las reacciones fueron incubadas por 30 min a 25°C. Luego fueron detenidas añadiendo 2 volúmenes de 0.075% de TFA (en agua). El patrón interno utilizado (para el HPLC) fue el GluNAc-MurNAc-pentapéptido (compuesto **5**, tabla 3.2). Los productos de la reacción fueron separados y cuantificados por HPLC en una columna C18 de fase reversa (Symmetry

Shield RP18, 5 μm , 3.9 \times 1500 mm; Waters) en un sistema PerkinElmer serie 200. La columna fue equilibrada con 0.05% de ácido trifluoroacético (en agua) y eluída con un gradiente lineal entre 0 y 15% de acetonitrilo durante 40 min, con un flujo de 1 ml/min. El eluido de la columna fue monitoreado a una longitud de onda $\lambda = 205$ nm. La actividad de AmpD se cuantificó por la tasa de desaparición del sustrato o la de aparición del tripéptido o pentapéptido según el caso. Los tiempos de reacción (t_R) fueron de 30.2 min para el sustrato **2**, 34.5 min para el **2a**, y 36.2 min para el **1**.

Tabla 3.1. Compuestos utilizados para las medidas de actividad enzimática de AmpD

Tripéptido = L-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP
 Pentapéptido = L-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala

Compuesto	Concentración	t_R	Estructura
1	1.5 μM	36.2 min	 <p>R = pentapéptido</p>
2	50 nM	34.5 min	 <p>R = tripéptido</p>
2a	100 nM	30.2 min	 <p>R = pentapéptido</p>
5 Patrón interno del HPLC	—	—	 <p>GluNAc-MurNAc-pentapéptido</p>

3.3.3. Cristalización de AmpD. Holoenzima, apoenzima, AmpD-SeMet y holoenzima a pH 5.5

Los ensayos de cristalización se realizaron mediante el método de difusión de vapor en gota sentada a una temperatura controlada y constante de 18°C. Las soluciones precipitantes contenían en general un tampón que permitió regular el pH y un agente precipitante que impulsó el proceso de cambio de fases anteriormente mencionado. En condiciones iniciales el agente precipitante se diluyó a la mitad en la gota con respecto del reservorio, y esta condición permitió iniciar el establecimiento de un posterior equilibrio de concentraciones por difusión de vapor, que concentró la solución de proteína favoreciendo la agregación y, en el mejor de los casos, la cristalización.

Posteriormente se realizó un proceso de escalado y optimización de los cristales inicialmente obtenidos, aumentado el volumen de la gota y realizando variaciones sistemáticas de la concentración del precipitante, valor del pH y concentraciones de las sales presentes en la solución de cristalización.

Se utilizaron sistemas de alto rendimiento (figura 3.15) para la búsqueda de las condiciones iniciales de cristalización. Este método comprendió la siguiente batería de soluciones comerciales: Crystal Screens I y II, LITE, Index y SaltRx de Hampton Research®; PACT Suite y JCSG+Suite de Quiagen®.

Las condiciones comerciales se dispensaron en placas Innovaplate™ SD-2 (sistema de gota sentada) (figura 3.15 izquierda). Luego de dispensar las soluciones precipitantes en el reservorio (65 µl) se mezcló, en una gota, 250 nl de cada una de ellas con 250 nl de la solución de AmpD pura (holoenzima en tampón 50 mM de Na₂HPO₄ pH 7.0, suplementado con 1 mM de NaN₃) a una concentración de 17 mg/ml, utilizando un robot Innovadyne Nanodrop™ ExtY (figura 3.15 derecha). Las placas fueron selladas con cinta adhesiva transparente y almacenadas a 18°C. Cristales inicialmente muy pequeños y maclados (ver figura 4.0, resultados) en forma de barras crecieron en la condición número 93 (0.1 M de Tris pH 5.5, 0.2 M Li₂SO₄ y 25% de PEG 3350) de la batería de condiciones comerciales JCSG+Suite. A continuación las gotas fueron escaladas hasta 1 µl de proteína y 1 µl de solución precipitante en placas Cryschem 24-1 (Hampton®), con un reservorio de 500 µl. El escalado y la optimización de esta condición (0.1 M Tris pH 6.0, 0.1 M Li₂SO₄ más 28% de PEG 3350) permitió el crecimiento de monocristales de alta calidad y con gran capacidad de difracción. Tanto la holoenzima como la apoenzima cristalizaron en estas condiciones mejoradas.

Con la AmpD-SeMet pura (concentración de 8 mg/ml en tampón 20 mM de Na₂HPO₄ pH 7.0, 1 mM DTT y 1 mM NaN₃), una vez optimizada la condición de la holoenzima, se realizaron los ensayos de cristalización en condiciones directamente escaladas utilizando placas Cryschem 24-1 (Hampton®). Se realizaron variaciones (concentración de PEG 3350 y Li₂SO₄ principalmente) sobre dicha condición hasta que fue optimizada a 0.1 M de Tris pH 6.0, 0.2 M de Li₂SO₄ más 29% de PEG 3350, logrando así cristales de AmpD-SeMet de muy buena calidad.

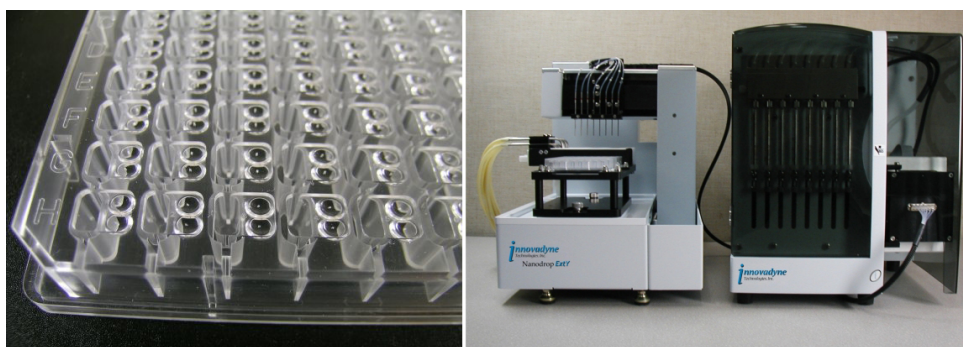
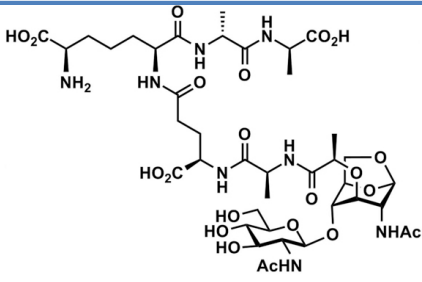
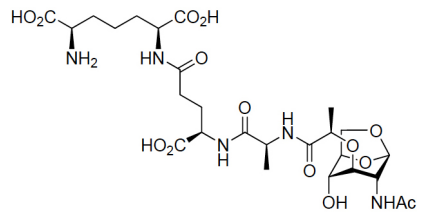
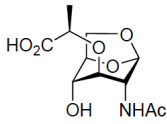
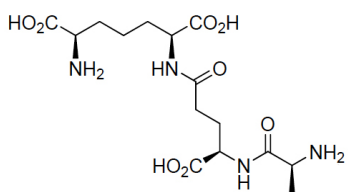


Figura 3.15. Microplacas Innovaplate™ SD-2 (izquierda), de gota sentada para sistemas de alto rendimiento de cristalización, en ella se pueden dispensar hasta dos gotas por pocillo y probar 96 condiciones. Robot de cristalización Innovadyne Nanodrop™ ExtY (derecha), dispensa gotas con un volumen de hasta 100 nl y con una gran precisión.

Con la intención de estudiar el entorno de coordinación del Zn²⁺ en la holoenzima, también se realizaron ensayos de cristalización barriendo valores de pH inferiores al

optimizado en la condición de cristalización antes determinada. Estos ensayos se efectuaron de igual forma en placas Cryschem 24-1 (Hampton®), con relaciones de gota 1:1 (1 μ l de solución de la holoenzima y 1 μ l de solución precipitante). En definitiva, la holoenzima cristalizó en la siguiente condición: 0.1 M de Tris pH 5.5, 0.1 M de Li_2SO_4 más 27% de PEG 3350.

Tabla 3.2. Compuestos utilizados para obtener complejos con los cristales de AmpD

Compuesto	Tipo	Fórmula	Peso Mol.	Estructura
1	substrato	$\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_{21}$	993.0 mg/mol	 <p>GluNac-AnhMurNAc-pentapéptido</p>
2	substrato	$\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{14}$	647.6 mg/mol	 <p>AnhMurNAc-tripéptido</p>
3	producto	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_7$	275.3 mg/mol	 <p>AnhMurNAc</p>
4	producto	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8$	390.2 mg/mol	 <p>Tripéptido</p>

3.3.3.1. Obtención de los complejos de AmpD con los productos de la reacción

Se ejecutaron ensayos de inmersión con los cristales de la holoenzima y la apoenzima utilizando los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** (tabla 3.2 y figura 1.4). Para ello, se prepararon soluciones de cristalización (0.1 M Tris pH 6.0, 0.1 M Li_2SO_4 más 28% de PEG 3350) con diversas concentraciones de estos compuestos (5 mM, 15 mM y 50 mM), que además se suplementaron con glicerol al 20%. Los cristales fueron sumergidos en estas soluciones en tiempos ascendentes, desde unos pocos segundos hasta varios minutos.

3.3.4. Toma de datos de difracción y resolución estructural

Los cristales de AmpD fueron sumergidos por 5 segundos en la solución de crioprotección (20% de glicerol diluido en solución de cristalización) antes de vitrificarlos a $\approx 100\text{K}$ por inmersión directa en nitrógeno líquido. Se recogieron datos de difracción hasta 1.7 \AA usando radiación sincrotrón en el ESRF (del inglés *European Synchrotron Radiation Facility*) en Grenoble. Las líneas de cristalografía de macromoléculas del ESRF, poseen sistemas de carga de cristales, y de toma de datos totalmente automatizados (figura 3.16). Los datos de MAD hasta 1.8 \AA , para los cristales de AmpD-SeMet, se tomaron a 100K en la línea BM14 utilizando un detector Marmosaic 225 CCD (oscilación de 1° y distancia entre el detector y el cristal de 169.26 mm). Los datos del pico, $\lambda = 0.978560\text{ \AA}$ máximo de f'' , punto de inflexión $\lambda = 0.978910\text{ \AA}$ máximo de f' , y remoto, $\lambda = 0.978400\text{ \AA}$, fueron procesados con los programas *XDS* (Kabsch, 1988) y *MOSFLM* (Leslie, 1992), y escalados con el programa *SCALA* (Evans, 1993), estos dos últimos forman parte del *paquete de programas CCP4* (*Collaborative Computational Project Number 4*, 1994). Los resultados del procesamiento de los datos se resumen en las tablas 4.1 y 4.3 de la sección de resultados.

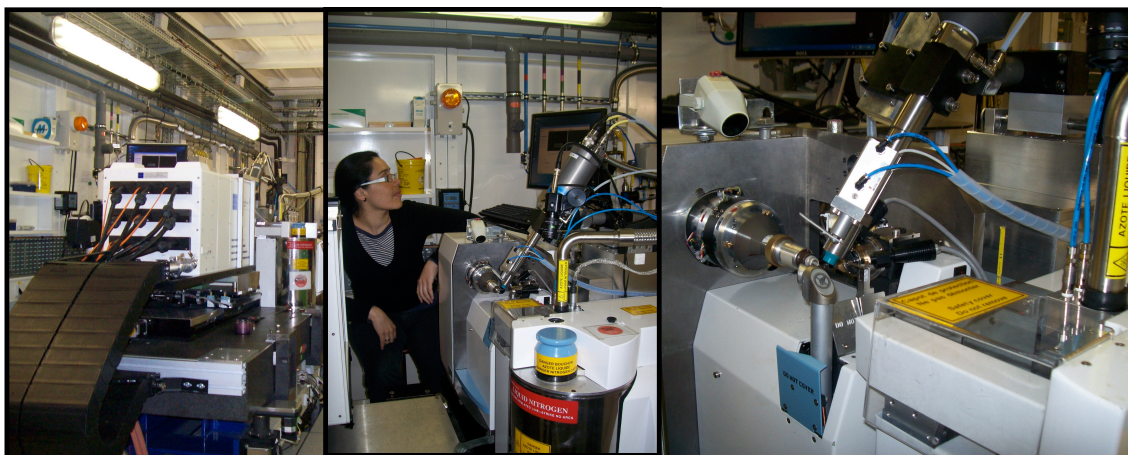


Figura 3.16. Detector ADSC (izquierda) y sistemas de carga automática de cristales (centro), goniométricos y de flujo seco de vapor de nitrógeno (derecha) de la línea ID23.

Los datos de difracción de la holoenzima, apoenzima, complejo con los productos de la reacción (AmpD-complejo) y holoenzima a pH 5.5 (AmpD-5.5), fueron recogidos en diversas oportunidades en las líneas ID14-4 (apoenzima y AmpD-complejo), ID29 (holoenzima) e ID23-2 (AmpD-5.5). Todos los conjuntos de datos de difracción de los distintos cristales fueron procesados con *XDS* (Kabsch, 1988) y *MOSFLM* (Leslie, 1992), y escalados con el programa *SCALA* (Evans, 1993) al igual que los datos de AmpD-SeMet. Los resultados del procesamiento de los datos correspondientes a cada uno de los cristales se resumen también en la tabla 4.3.

Con la finalidad de estimar las fases y construir un modelo inicial, los datos de MAD de AmpD-SeMet, fueron preparados para ser introducidos en el servidor *Auto-Rickshaw* (<http://www.embl-hamburg.de/Auto-Rickshaw/>) (Panjikar *et al.*, 2005). Éste

permite realizar la resolución de las estructuras, integrando de forma automatizada diversas estrategias cristalográficas. El servidor es capaz de discriminar los pasos a seguir, y elegir los programas a utilizar durante la resolución estructural, a través de un novedoso sistema informático de toma de decisiones que depende de la calidad de los datos y de los resultados obtenidos en cada paso realizado (Panjikar *et al.*, 2005). A continuación, se describen los pasos seguidos por *Auto-Rickshaw* en la resolución estructural de AmpD-SeMet. El programa *ABS* (Sheldrick & Schneider, 1997) fue utilizado para el cálculo de los factores de estructura, mientras que las posiciones de los selenios fueron halladas por el programa *SHELXD* (Schneider & Sheldrick, 2002; Sheldrick, 2002). Dichas posiciones fueron utilizadas para el faseado inicial por el programa *SHELXC* (Schneider & Sheldrick, 2002; Sheldrick, 2002), asumiendo 3 moléculas en la unidad asimétrica. La ocupación de toda la subestructura de los átomos pesados fue refinada, calculando finalmente fases a una resolución de 1.8 Å, con el programa *MLPHARE* (*Collaborative Computational Project Number 4*, 1994). Los mapas de densidad electrónica, calculados en un principio por el programa *RESOLVE* (Terwilliger, 2000), fueron mejorados con el programa *DM* (Cowtan, 1994) (el cual realiza un “aplanado” de solvente) asumiendo un 38% de contenido de agua en el cristal. Seguidamente se realizó un trazado automático de la cadena polipeptídica, para los tres monómeros presentes en la unidad asimétrica, utilizando el programa *ARP/wARP* (Perrakis *et al.*, 1999).

Los modelos iniciales fueron completados y mejorados manualmente con los programas *O* (Jones *et al.*, 1991) y *COOT* (Emsley & Cowtan, 2004); y el refinamiento del modelo fue llevado a cabo con el programa *PHENIX* (Adams *et al.*, 2010). Los cristales de la holoenzima, la apoenzima, AmpD-complejo y AmpD-5.5 fueron “faseados” por *reemplazo molecular*, con el programa *MolRep* de *CCP4* y utilizando como modelo la estructura resuelta y refinada de AmpD-SeMet. El refinamiento de todas estas estructuras también se realizó con *PHENIX*. Los modelos finales presentaron buenos parámetros estereoquímicos, verificados con *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993), y excelentes valores de *R* y *R*_{free} (tabla 4.3).

3.3.5. Cálculos de *Dinámica Molecular*. *Targeted Molecular Dynamics* (TMD)

Las simulaciones de los cambios conformacionales utilizando la técnica de **TMD** fueron realizadas en colaboración con la Dra. Isabelle André y la Dra. Sophie Barbé de la Universidad de Toulouse, Francia.

Las transiciones conformacionales entre la AmpD activa (AmpD^a) y la AmpD inactiva (AmpDⁱ) fueron simuladas utilizando el método de TMD (del inglés *Targeted Molecular Dynamics*) implementado en el paquete de programas *AMBER 9* (Case *et al.*, 2005). Los modelos de coordenadas utilizados, se correspondieron a la conformación inactiva resuelta por RMN (código PDB: 1J3G), y la conformación activa resuelta mediante difracción en este trabajo. Se añadieron los átomos de hidrógeno a las histidinas basándose en los patrones derivados del análisis de la estructura de RMN. Las histidinas 34, 61, 75, 96 y 154 fueron protonadas únicamente en el N ϵ , mientras que las histidinas 18 y 69 se protonaron en ambos nitrógenos, N ϵ y N δ . Para la realización del TMD, se implementó un campo de fuerza *ff03* (Duan *et al.*, 2003; Lee & Duan, 2004) para todos los átomos y un modelo de solvatación *Generalized Born/Surface Area*. La preparación de las simulaciones consistió en seis ciclos iniciales de minimización de energía (200 pasos de descenso rápido, seguido de 500 pasos del método de gradiente conjugado), en los cuales la cadena principal de la proteína fue restringida por un

potencial armónico. La constante de fuerza fue disminuida de manera progresiva durante el procedimiento de minimización de energía desde 20 a 1 Kcal mol⁻¹ Å⁻². Posteriormente se realizó un calentamiento lento en un período de 20 ps, seguido de nuevas minimizaciones de energía. Mientras, los átomos de la cadena principal se mantuvieron restringidos por un potencial armónico de 10 Kcal mol⁻¹ Å⁻². En la temperatura final, el sistema fue equilibrado durante 80 ps, en este momento las restricciones armónicas de los átomos de la cadena principal decrecieron de 10 a 1 Kcal mol⁻¹ Å⁻². Finalmente se efectuó un equilibrado sin restricciones durante 20 ps.

Se utilizaron dinámicas de Langevin para mantener la temperatura a 303K. El amplio rango de fuerzas electrostáticas fue manejado por el método de *particle-mesh* (partícula de malla) de Ewald. El tiempo de los pasos de la simulación fue de 20 fs, y el algoritmo de *SHAKE* fue usado para constreñir las distancias de todos los enlaces químicos que involucraban átomos de hidrogeno en sus valores en el equilibrio.

El método de TMD permite observar transiciones conformacionales significativamente grandes, entre dos conformaciones puntuales (que representan los puntos finales de la transición) y conocidas de una proteína. Esta capacidad, a día de hoy, se encuentra por encima del alcance atómico de las simulaciones de Dinámica Molecular convencionales. Esto, se logra mediante una fuerza de direccionamiento adicional, basada en un peso específico otorgado a la RMSD. (desviación cuadrática media), y que es ponderado respecto de una conformación-blanco de referencia. El valor específico se aplica en el campo de fuerza como un término extra en forma de potencial armónico en la ecuación 3.5, en donde E es la energía del potencial de polarización en Kcal/mol durante la simulación de TMD, kr es la constante de fuerza, N es el número de átomos, $RMSD_t$ es la desviación cuadrática media de la simulación en el tiempo t , relativo a la estructura blanco, y $taRMSD_t$ es el valor de RMSD en el tiempo t . La transición conformacional entre la geometría inicial y la final (blanco), es conducida mediante el decrecimiento de $taRMSD_t$ a 0 como función del tiempo de simulación. La aplicación de una constante de fuerza entre 0.04 y 0.06 Kcal mol⁻¹ Å⁻² en los átomos pesados de la proteína durante 1 ns fue aparentemente suficiente para encontrar un camino para la transición.

Las trayectorias resultantes fueron analizadas a través del módulo *Ptraaj* del paquete *AMBER*. La RMSD fue calculada para los átomos de la cadena principal utilizando un ajuste por mínimos cuadrados. Las distancias entre residuos se calcularon desde sus respectivos centros de masa.

$$E = 0.5 kr \times N \times \left[(RMSD_t) - (taRMSD_t) \right]^2$$

Ecuación 3.5. Energía del potencial de polarización durante la simulación de TMD (Kcal mol⁻¹).

3.3.6. Espectroscopia de Absorción de rayos X (XAS)

Los ensayos para corroborar estructuralmente los estados de coordinación del Zn, a distintos pHs, fueron realizados en la línea española *SpLine* (BM25) del ESRF, en Grenoble. El procesamiento de los datos y la resolución estructural se realizó en colaboración con los doctores Germán Castro y Pilar Ferrer del CRG del ESRF.

Las medidas concretas de XAS, fueron tomadas en la línea BM25-A del ESRF. Los espectros de XAS para AmpD en el punto de absorción del Zn, fueron medidos a

temperatura ambiente en varias condiciones y valores de pH: proteína cristalizada en solución de cristalización a pH 6.0, y soluciones de proteína a pH 5.6, 7.0 y 8.2. Las muestras fueron colocadas en capilares de cuarzo y/o celdas especiales de teflón selladas con cinta Kapton, dependiendo de la cantidad y concentración de la muestra. Se realizaron varios barridos para cada muestra para mejorar la relación señal/ruido y verificar la estabilidad de la muestra a través del tiempo. El haz incidente fue monitoreado con una cámara de ionización rellena de N₂. Los datos fueron recolectados en el modo de fluorescencia, con un detector de energía dispersiva (13 elementos, Si/Li). Los datos de XAS para los cristales de proteína suspendidos en solución madre fueron medidos hasta un valor $k=15$, mientras que las soluciones de proteína pura a distintos valores de pH hasta un valor $k=12$. La línea de fluorescencia Zn-KA fue recogida con un detector ubicado paralelamente al campo de polarización eléctrico de los rayos X (*i.e* formando un ángulo de 90° con el haz de rayos X incidente). El tratamiento de los datos se realizó con el programa *ATHENA* y los análisis de la señal de EXAFS (del inglés *Extended X-ray Absorption Fine Structure*) con el programa de ajuste *ARTEMIS* (Ravel & Newville, 2005). Las transformadas de Fourier del EXAFS fueron obtenidas utilizando una *ventana de Hanning* entre 2.5-10, 2.6-7.8, 2.6-8.8 y 2.4-8.4 Å⁻¹ para los cristales (pH 6.0) y las soluciones de proteína a los valores de pH de 5.6, 7.0 y 8.2 respectivamente. Las señales filtradas del EXAFS, resultantes de la transformación de Fourier de la señal experimental, se consiguieron aplicando una *ventana de Hanning* entre 1.0 y 3.3 Å. Las amplitudes dispersadas y las funciones de fase de las esferas de coordinación fueron calculadas a partir de la estructura de rayos X de AmpD, con el código *ce* FEFF6 (Mustre de León *et al.*, 1991).

3.4 RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE GP61

3.4.1. Clonaje, sobreexpresión y purificación de la Gp61 y Gp61-SeMet

La proteína purificada fue aportada por la profesora Lucia B. Rothman-Denes del Departamento de Biología Molecular, Genética y Biología Celular de la Universidad de Chicago (EEUU). Todo el trabajo de clonaje, sobreexpresión y purificación ha sido reportado previamente en el trabajo de Stojkovic & Rothman-Denes (2007). La proteína Gp61 con la sustitución de las metioninas por selenio-metioninas (Gp61-SeMet) fue producida aplicando la metodología anteriormente explicada para AmpD-SeMet (punto 3.3.2) con algunas pequeñas modificaciones. Finalmente la purificación de Gp61-SeMet también se realizó con el método reportado para la Gp61 salvaje (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007).

También se realizaron mutantes sitio-específicos (datos no publicados) con un fenotipo inactivo, mutando el ácido glutámico 26 por alanina (E26A), y otro mutante con una delección de los residuos 1-21 (hélice transmembrana).

3.4.2.1. Técnicas de cristalización de alto rendimiento, escalado y optimización de los cristales de Gp61 y Gp61-SeMet

Los ensayos de cristalización se realizaron mediante el método de difusión de vapor en gota sentada a una temperatura controlada de 18°C. Las soluciones precipitantes contenían en general un tampón que permitió regular el pH y un agente precipitante que impulsó el proceso de cambio de fases anteriormente mencionado. A

esta solución precipitante le fueron añadidos otros componentes (aditivos), durante el proceso de optimización, que facilitaron el transcurso de la cristalización mejorando el orden interno y el crecimiento de los cristales. En condiciones iniciales el agente precipitante se diluyó a la mitad en la gota con respecto del reservorio; esta condición permitió iniciar el establecimiento de un equilibrio de concentraciones por difusión de vapor que concentró la proteína, favoreciendo la agregación y en el mejor de los casos la cristalización (agregación ordenada).

Inicialmente se contó con sistemas de alto rendimiento para la búsqueda de las condiciones iniciales de cristalización (figura 3.15). Como se mencionó anteriormente, el método comprendió un gran número de pruebas simultáneas con un gasto mínimo de proteína. Se utilizó la siguiente batería de condiciones comerciales: Crystal Screens I y II, LITE, Index y SaltRx de Hampton Research®; PACT Suite y JCSG+Suite de Qiagen®.

Esta variedad de condiciones se dispensaron en el reservorio de las placas Innovaplate™ SD-2 (76 µl por pocillo). Luego, se mezcló una gota de 250 nl de cada una de las condiciones comerciales, en su correspondiente posición de la placa, con 250 nl de la solución de Gp61 pura (tampón 10 mM de Tris pH 8, 20 mM de NaCl) a una concentración de 7 mg/ml, utilizando un robot Innovadyne Nanodrop™ ExtY. Las placas fueron posteriormente selladas con cinta adhesiva transparente, almacenadas a 18°C y observadas durante varias semanas. Se obtuvieron cristales iniciales de buen aspecto macroscópico en la condición número 29 de Index (Hampton®), compuesta por Tacsimato™ 60% pH 7.0. Estas condiciones fueron escaladas manualmente a gotas de 1 µl de proteína más 1 µl de solución precipitante, en placas Cryschem 24-1 (Hampton®). Los cristales escalados a pesar de su buen aspecto macroscópico (forma y tamaño) y las buenas propiedades ópticas exhibidas (fuerte polarización de la luz) (ver figura 4.30, resultados) demostraron no ser buenos dispersores de los rayos X, y por esta razón se procedió a optimizar las condiciones de cristalización (inicialmente sólo con el fenotipo salvaje) realizando variaciones de la condición inicial (concentración de Tacsimato™, proporción de la gota, pH) y añadiendo aditivos (detergentes). Finalmente se obtuvieron cristales que difractaron los rayos X hasta 2.4 Å en la condición siguiente: Tacsimato™ 55% pH 6.5, Tesit™ (Hampton®) 200 mM.

3.4.3. Recogida de los datos de difracción de los cristales de Gp61

La concentración final de Tacsimato™ (55% v/v) actuó como crío-protector y por tanto no se utilizó ningún aditivo para proteger del congelamiento los cristales durante la recolección de datos.

Las medidas fueron tomadas en las líneas ID23-2 (cristales nativos) e ID14-4 (derivados de selenio-metionina) del ESRF en Grenoble. En ID23-2 se tomaron datos a una $\lambda = 0.8726$ Å y a una temperatura de 100K, utilizando un detector ADSC a una distancia de 360 mm. En la línea de investigación ID14-4, se recogieron diversos conjuntos de datos de MAD, cada uno de los cuales se constituía de tres longitudes de onda, tomando en cuenta la dispersión anómala del selenio. En este sentido se recogieron datos en el pico de absorción ($\lambda = 0.97950$ Å máximo de f''), en el punto de inflexión ($\lambda = 0.97955$ Å máximo de f') y a una longitud de onda remota ($\lambda = 0.97550$ Å); todas ellas determinadas por un barrido energético automático de la estación de trabajo. Un total de 180° fueron colectados para cada una de las longitudes de onda utilizando una oscilación de 1° por imagen. La distancia del cristal al detector (también un ADSC)

fue fijada a 358.57 mm. Finalmente se obtuvo un conjunto de datos de MAD hasta 2.4 Å de resolución.

3.4.4. Cálculo de las intensidades y factores de estructura

Las imágenes fueron procesadas con el programa *MOSFLM* (Leslie, 1992) y escaladas con *SCALA* (Evans, 1993). Para el cálculo del módulo de los factores de estructura se utilizó el programa *TRUNCATE* perteneciente al paquete de programas de cristalografía *CCP4* (Baley, 1994). También se utilizó el paquete de programas *XDS* (Kabsch, 1993), para el procesamiento de las imágenes, el escalado y cálculo de los módulos de los factores de estructura para los conjuntos de datos de Gp61-SeMet a fin de observar rápidamente la presencia de señal de dispersión anómala, la calidad de la misma y el alcance en resolución.

3.4.5. Cálculo de las fases y determinación de posiciones de los átomos de selenio

Partiendo de la hipótesis de dos moléculas en la unidad asimétrica, se buscaron 8 átomos de selenio (4 por monómero). Para ello, se utilizaron los programas *SHELXC*, *SHELXD* y *SHELXE* (Schneider & Sheldrick, 2002; Sheldrick, 2002), a través de la interfaz gráfica *HKL2MAP* (Pape & Schneider, 2004). *SHELXD* encontró muchas soluciones posibles obteniendo buenos coeficientes de correlación, el mejor de ellos con un 46.32% y que contenía todas las posiciones de los selenios esperadas en la unidad asimétrica del cristal. Los cálculos realizados por *SHELXE* permitieron discriminar entre las subestructuras correcta e invertida. Los mapas de densidad electrónica poseían la calidad suficiente para la interpretación, esqueletonización y el inicio del trazado de la subestructura. Pero a pesar de ello se encontraron zonas poco definidas y se optó por la resolución con un programa computacionalmente más potente.

3.4.6. Resolución con *SHARP*

Para mejorar los resultados obtenidos con el programa *SHELXE*, las posiciones de los selenios localizadas mediante *SHELXC/D* fueron introducidos en el programa *SHARP* (de La Fortelle & Bricogne, 1997) utilizando el parámetro de “*maximum-likelihood*” de átomos pesados en el formato “*auto-run*” (sistema automático de procesamiento de los datos), para dos de las longitudes de onda (pico y el punto de inflexión), ya que una de ellas (la longitud de onda remota) mostró muy baja calidad y no contribuyó a mejorar la calidad de los mapas. Este programa realizó de forma automática el análisis de los datos, determinó la subestructura de átomos pesados y resolvió el problema de las fases pasando posteriormente al aplanamiento de solvente con el programa *DM*, integrado dentro de la interfaz gráfica de *SHARP*.

3.4.6.1. Determinación de los mapas de densidad electrónica

El cálculo y modificación de los mapas de densidad electrónica se realizó con el programa *SOLOMON* (Abrahams & Leslie, 1996) integrado en el procesamiento automático de *SHARP*. El coeficiente de correlación final fue $|E^2| = 0.632$ con una optimización del contenido de solvente hasta el 58.4%.

3.4.7. Construcción del modelo estructural de Gp61

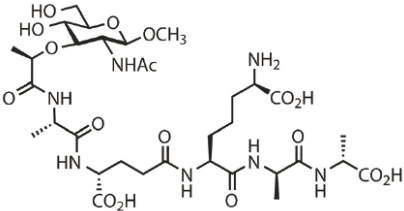
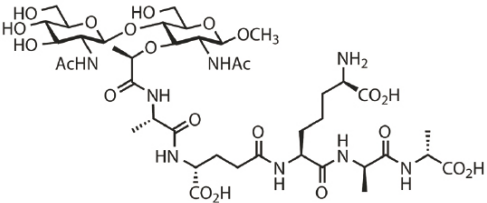
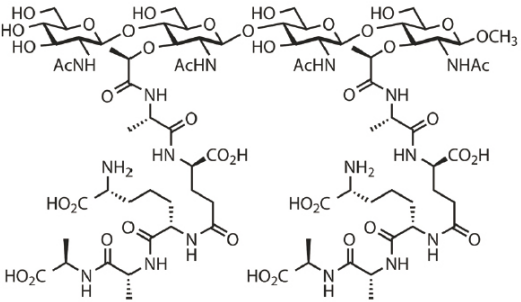
El modelo se construyó automáticamente con el programa *BUCANEER* (CCP4), pero dada la fragmentación del modelo obtenido, la mayor parte del mismo fue trazado manualmente con el programa *O* (Jones *et al.*, 1991).

3.4.8. Refinamiento del modelo

Una vez trazado el modelo inicial de Gp61-SeMet, el refinamiento se realizó utilizando la información de máxima resolución del mejor conjunto de datos (pico de Gp61-SeMet a 2.4 Å de resolución). El proceso de refinamiento se realizó con el programa *CNS* (Brunger *et al.*, 1998) y consistió en una primera etapa de dinámica molecular *simulated annealing*, seguida de un refinamiento individual de las posiciones atómicas de los factores de agitación térmica (factores B) para todos los residuos del modelo. A continuación, se calcularon los mapas de densidad electrónica de diferencia fo-*fc* y 2fo-*fc*, con los cuales fue modificado y corregido manualmente el modelo con el programa *O*, en estaciones de trabajo *Silicon Graphics*. Se verificó que los valores de torsión de los enlaces estuviesen dentro de los permitidos; para ello se evaluaron los ángulos de torsión, orientación peptídica y conformación de rotámeros estables, entre otros, con el programa *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993).

Tabla 3.3. Compuestos utilizados para obtener complejos con los cristales de Gp61

Pentapéptido = L-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala
 Monosacárido= MurNAc
 Disacárido= GluNAc-MurNAc

Compuesto	Fórmula	Peso Mol.	Estructura
DHL95 Monosacárido- pentapéptido	C ₃₃ H ₅₅ N ₇ O ₁₇	821.8 mg/mol	
DHL101 Disacárido- pentapéptido	C ₄₁ H ₆₈ N ₈ O ₂₂	1025.0 mg/mol	
DHL100 Tetrasacárido- dipentapéptido	C ₈₁ H ₁₃₂ N ₁₆ O ₄₃	2018.0 mg/mol	

3.4.9. Obtención de complejos de Gp61 con substratos sintéticos análogos a la pared bacteriana de *E. coli*

Los análogos de la pared bacteriana de *E. coli* (tabla 3.3) fueron proporcionados por el Prof. Dr. Shahriar Mobashery de la Universidad de Notre Dame, Indiana (EEUU). Debido a que durante el tiempo de realización de este trabajo fue imposible cristalizar el mutante E26A de Gp61, se realizaron ensayos de cocristalización e inmersión con la proteína salvaje y los cristales nativos respectivamente.

3.4.10. Análisis de la estructura cuaternaria de Gp61: experimentos de velocidad de sedimentación por Ultracentrifugación Analítica (UCA)

Los experimentos de velocidad de sedimentación por Ultracentrifugación Analítica (UCA), permiten estimar el **coeficiente de sedimentación** de una macromolécula, s , y el de difusión, D , ambos relacionados con su forma y tamaño. Estos coeficientes están definidos por la relación de Svedberg (ecuación 3.6) (Lebowitz *et al.*, 2002). Donde u es la velocidad radial observada de la macromolécula, ω es la velocidad angular del rotor, r es la posición radial, ω^2 es el campo de centrifugación, M es la masa molar, \bar{v} es el volumen parcial específico, ρ es la densidad del solvente, N_A es el número de Avogadro, f es el coeficiente de fricción translacional, D es el coeficiente de difusión y R es la constante de los gases. Por tanto, es posible determinar el nivel de asociación de las macromoléculas calculando el peso molecular en solución.

Los experimentos se realizaron utilizando una ultracentrífuga Beckman Optima XL-A de seis canales (paso óptico de 12 mm), equipada con un rotor AnTi50. Las muestras de Gp61 pura (a una concentración final de 0.8 mg/ml) fueron equilibradas en tampón A (20 mM de Tris pH 8.5, 200 mM de NaCl). La velocidad angular se fijó en 45000 r.p.m. y se centrifugó durante 27 horas a 20 °C. Durante el experimento se siguió la absorbancia de la muestra a 280 nm.

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f} = \frac{MD(1 - \bar{v}\rho)}{RT}$$

Ecuación 3.6. Ecuación de Svedberg.

El coeficiente de sedimentación, s , se calculó con el programa *SEDFIT* (Schuck, 2000). El coeficiente de fricción, f , se calculó a partir de la masa molecular teórica del dímero de Gp61 (<http://us.expasy.org>) y el coeficiente de sedimentación. Por su parte, el coeficiente de fricción de la esfera hidratada (f_0) se estimó haciendo uso de un coeficiente de hidratación de 0.30 g de agua/g de proteína, estimado a partir de la secuencia de la proteína (Kuntz, 1971). La densidad de la disolución se estableció en 1 g/cm³ y la viscosidad en 0.01 P.

3.5. OTROS PROGRAMAS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES COMPLEMENTARIAS

Los alineamientos de secuencias peptídicas fueron realizados con varios

programas como *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990), *ClustalX* y *ClustalW2* (Thompson *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1997), *Jalview* (Waterhouse *et al.*, 2009) y desde varios servidores web distintos:

- <http://expasy.org/>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/cluastalw2>
- <http://www.jalview.org/>

Por otra parte, el análisis visual de las estructuras, representación gráfica, elaboración de figuras y la toma de imágenes para las películas generadas a partir de la información de TMD, se realizó con el programa *PyMOL* (DeLano, 2002).

Los cálculos del volumen de los sitios activos se llevaron a cabo con el servidor CASTp (Dundas *et al.*, 2007) (<http://sts.bioengr.uic.edu/castp/>). Dicho servidor permite determinar el espacio disponible en los sitios activos de las proteínas y además sugiere sitios activos putativos, según las características volumétricas de las regiones superficiales o expuestas de las proteínas.

También se utilizó el servidor *DALI* (Holm & Rosenström, 2010), para realizar búsquedas basadas en la homología estructural, sobre la base de datos del PDB. Este tipo de indagaciones pueden arrojar similitudes biológicamente relevantes, que serían difíciles de detectar por una simple comparación de la homología en la secuencia primaria de las proteínas (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/start).

Para generar películas y analizar inicialmente los cambios estructurales entre las dos conformaciones se utilizó el servidor *Yale Morph Server* (<http://molmovdb.org/morph>). Se escogió la opción de 30 imágenes o pasos entre los puntos iniciales y finales (estructuras de RMN y rayos X de AmpD). Este servidor realiza un refinamiento de cada paso a través de una minimización de energía.

3.5.1. Espectrometría de masas

Esta técnica se basa en la capacidad de ionización de las moléculas es capaz de separarlas en relación a su masa/carga. Fue utilizada para corroborar la inclusión de selenio en las proteínas AmpD-SeMet y Gp61-SeMet.

Para los experimentos de espectroscopía de masas se recurrió al Servicio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC). Se utilizó un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) equipado con un láser de nitrógeno ($\lambda = 337$ nm; anchura de pulso = 3 ns; $\nu = 20$ Hz) y una fuente iónica con extracción retardada. Los iones positivos generados por la resonancia láser fueron introducidos en el tubo de vuelo (1.3 m de longitud) con un voltaje de aceleración de 25 kV, trabajando en modo lineal. Todos los espectros de masas se obtuvieron recogiendo una medida de 5000 disparos, y la matriz utilizada fue ácido sinapínico (10 mg/ml en una mezcla TFA al 0.21% y acetonitrilo al 30%). La calibración necesaria para los espectros de masas fue externa, empleándose apomiglobina de caballo.

3.5.2. Estimación de las concentraciones de proteína

La estimación de las concentraciones de proteínas se realizó por espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible, en un espectrofotómetro ND-1000 de NanoDrop®. Se midió el espectro de absorción a 280 nm y se calcularon las concentraciones basadas en los espectros de extinción molar teóricos calculados para AmpD ($31.960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y Gp61 ($30.110 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4. RESULTADOS

4.1. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE AMPD

4.1.1. Cristalización de la holoenzima

El empleo de sistemas de alto rendimiento para el proceso de cristalización con la holoenzima, dio como resultado el crecimiento de cristales muy maclados en diversas condiciones iniciales (tabla 4.0 y figura 4.0). Estos cristales aparecieron en períodos aproximados de entre 3 y 7 días. De todas las condiciones con resultados positivos que se muestran en la tabla 4.0, se escaló la condición número 93 de la batería de soluciones comerciales JCSG, compuesta por 0.1 M de Tris pH 5.5, 0.2 M Li_2SO_4 y 25% de PEG 3350.

Tabla 4.0. Condiciones de cristalización de la AmpD salvaje¹ con resultados positivos en el barrido inicial de alto rendimiento

Condición	Precipitante (m/v)	Tampón ²	Aditivo	Resultado
Nº 93 de JCSG	25% PEG 3350	Bis-Tris pH 5.5	0.2 M Li_2SO_4	Agujas macladas Barritas pequeñas (monocristales)
Nº 5 de JCSG	20% PEG 3350	Formiato de amonio pH 6.6 (0.2 M)		Agujas muy macladas
Nº 94 de JCSG	25% PEG 3350	Bis-Tris pH 5.5	0.2 M Acetato de amonio	Agujas muy macladas
Nº 95 de JCSG	25% PEG 3350	Bis-Tris pH 5.5	0.2 M MgCl_2	Agujas muy macladas
Nº 43 de INDEX	25% PEG 3350	Bis-Tris pH 6.5		Muchas agujas muy macladas
Nº 78 de INDEX	25% PEG 3350	Bis-Tris pH 5.5	0.2 M Acetato de amonio	Muchas agujas muy macladas
Nº 74 de INDEX	25% PEG 3350	Bis-Tris pH 5.5	0.2 M Li_2SO_4	Agujas macladas Barritas delgadas (monocristales)

¹Proteína pura a 17 mg/mL en 50 mM de Na_2HPO_4 pH 7.0, suplementado con 1 mM NaN_3

²La concentración de los tampones fue 100 mM, a menos que se indique lo contrario

Los cristales fueron optimizados realizando variaciones sistemáticas del valor del pH (entre 5.0 y 7.0), la concentración del PEG 3350 (entre 20-30%) y la concentración del Li_2SO_4 . Finalmente se consiguieron monocristales, con un excelente aspecto macroscópico y buenas propiedades ópticas (polarización de luz visible). La condición final fue la siguiente: 0.1 M de Tris pH 6.0, 0.1 M Li_2SO_4 y 25% de PEG 3350. Estos cristales crecieron en 4 días y alcanzaron un tamaño máximo de $0.5 \times 0.1 \times 0.1$ mm (figura 4.1).

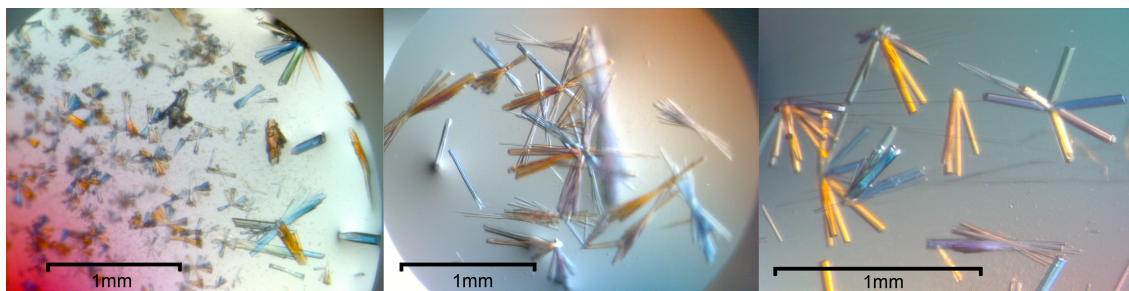
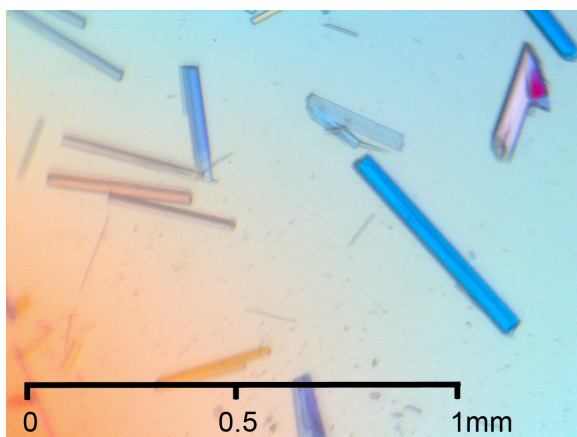


Figura 4.0. Cristales iniciales obtenidos en los experimentos de alto rendimiento (barrido inicial de las condiciones de cristalización). A la izquierda se observan los cristales crecidos en la condición número 43 de INDEX. En el centro, los cristales de la condición número 74 de INDEX y a la derecha los cristales de mejor aspecto inicial, que se correspondieron a la condición 93 de JCSG (aunque las últimas dos condiciones poseen los mismos componentes como se aprecia en la tabla 4.0).

A pesar del éxito en la obtención de monocristales, siempre hubo presencia de cristales maclados en las gotas optimizadas; este hecho, conjuntamente con el diminuto tamaño de los cristales, dificultó la elección de los mismos durante el montaje con lazos. Fue la difracción y el posterior procesado de los datos el único medio para discernir de forma definitiva entre los cristales maclados y los monocristales.



Condición de cristalización de la holoenzima

Tampón: 0.1 M de Tris pH 6.0

Precipitante: 25% de PEG 3350 (m/v)

Aditivo (sal): 0.1 M Li_2SO_4

Volumen de la gota: 2 μl

Relación de gotas (proteínas/precipitante): 1:1

Figura 4.1. Cristales de AmpD salvaje obtenidos en la condición de cristalización escalada y optimizada manualmente.

4.1.2. Recolección de los datos de difracción de la holoenzima

Con los mejores cristales de AmpD se colectaron datos de difracción de rayos X en la línea ID29 del ESRF. Se obtuvo un excelente conjunto de datos hasta una resolución de 2.0 Å (figura 4.2). El indexado de los datos permitió determinar que los cristales pertenecían a un sistema cristalino trigonal definido por el Grupo Espacial $P3_2$. La celdilla presentó unas dimensiones de $a = b = 67.7$ Å, $c = 92.8$ Å, $\alpha = \beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120.0^\circ$. Los resultados del procesamiento de las imágenes (indexado, integración y escalado de las reflexiones) se resumen en la tabla 4.1. Teniendo en cuenta la masa molecular de AmpD (con 187 residuos), el volumen de la celdilla y la resolución de los datos de difracción, se determinó la presencia probable de 3 moléculas en la unidad asimétrica con un contenido de solvente cercano al 38%. El coeficiente de Matthews fue de 2.0 Å³ Da⁻¹ (Matthews, 1968).

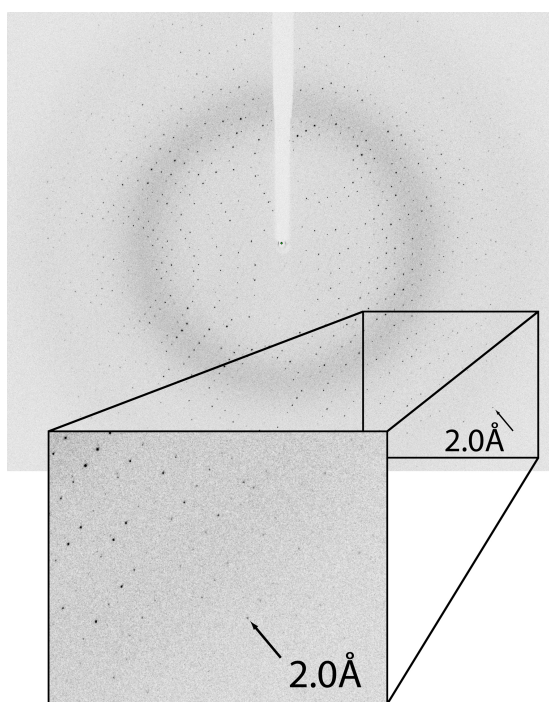


Figura 4.2. Patrón de difracción de la holoenzima obtenidos en la línea ID29 del ESRF. El patrón mostró reflexiones hasta una resolución de 2.0 Å.

Tabla 4.1. Estadísticas del procesado de los datos de difracción de la holoenzima

Parámetros	Holoenzima
Sistema cristalino	Trigonal
Grupo Espacial	$P3_2$
Celdilla Unidad	
a, b, c (Å)	67.7, 67.7, 92.8
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0
Moléculas en la UA	3
Solvente (%)	38%
Fuente de Radiación	X, sincrotrónica
Temperatura (K)	100
Longitud de Onda (Å)	0.97625
Resolución (Å)	32.4-(2.2-2.0)
Reflexiones únicas	32,155
Compleitud (%)	100 (100)
Multiplicidad	5.8 (5.7)
* R_{merge} (%)	11.0 (48.2)
$I/\sigma(I)$	12.4 (2.2)

Los valores entre paréntesis corresponden a la concha de mayor resolución.

* $R_{\text{sym}} = \sum |I - I_{\text{av}}| / \sum I$, para todo el rango de resolución.

4.1.3. Resolución estructural de la holoenzima por *Reemplazo Molecular*

El primer método aplicado para resolver la estructura cristalina de la AmpD de *C. freundii*, fue el método de Reemplazo Molecular (MR). Para ello se utilizó la estructura, previamente resuelta por RMN (AmpD-RMN), de AmpD de la misma especie (código PDB 1J3G) y, por tanto, con un 100% de identidad. Sin embargo y a pesar de las diversas estrategias implementadas: búsqueda de 1, 2 y 3 moléculas en la unidad asimétrica, fragmentación del modelo, eliminación de las regiones más móviles como el N-terminal y C-terminal de la estructura, utilización de cada una de las 20 estructuras que forman parte del PDB de RMN; utilización de diversos programas de MR como *AmoRE*, *MolRep* y *PHASER*, variación y ajuste de diversos parámetros como resolución y distancia entre moléculas, nunca se obtuvo una solución inequívoca. Los valores del factor de correlación no alcanzaron los mínimos necesarios que permitiesen definir una solución plausible. Además, las soluciones arrojadas por todos los programas siempre presentaron problemas de empaquetamiento (choques entre las moléculas). Las soluciones escogidas para continuar el proceso de resolución estructural, presentaron valores muy elevados de R y R_{free} durante el refinamiento (ambos >60%). Y por otra parte, los mapas calculados para algunas de las soluciones nunca fueron suficientemente interpretables.

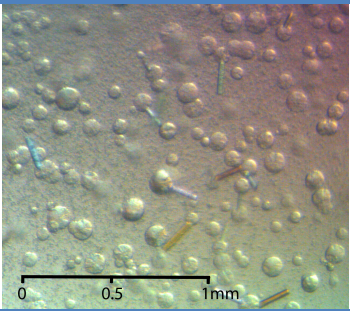
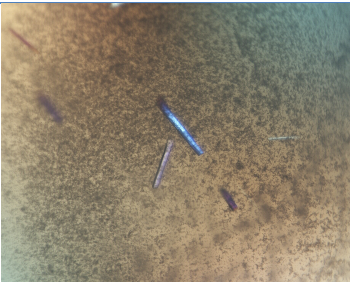
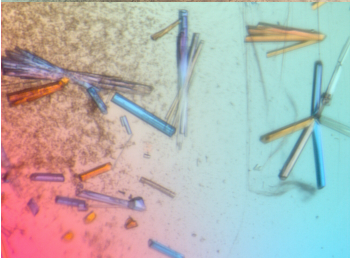
En resumen, que a pesar de utilizar la estructura tridimensional de la misma proteína (aunque resuelta por RMN) para el “faseado” inicial a través del método de MR, no fue posible determinar una solución satisfactoria para las funciones de rotación y traslación.

4.1.2. Resolución estructural *de novo* de AmpD. Resolución de AmpD-SeMet, holoenzima, apoenzima, AmpD-pH 5.5 y AmpD-complejo

4.1.2.1. Cristalización de AmpD-SeMet, apoenzima, y AmpD-pH5.5

Utilizando como guía los resultados obtenidos para la cristalización de la holoenzima (sección 4.1.1.1), se realizaron variaciones alrededor de la condición de cristalización (se montaron ensayos de cristalización manuales en gota sentada), hasta finalmente obtener cristales de las otras proteínas utilizadas, el derivado de SeMet y la apoenzima (AmpD sin el ión metálico). Todos ellos mostraron las características macromoleculares generales de los cristales obtenidos con la holoenzima. En la tabla 4.2 se resumen las condiciones de cristalización de cada una de las proteínas, que no mostraron diferencias significativas, y además se observa el aspecto general de las gotas y de los cristales obtenidos.

Tabla 4.2. Condiciones de cristalización de las diversas proteínas AmpD

Proteína	PEG 3350	Bis-Tris ¹	Li ₂ SO ₄	Cristales ²
AmpD-SeMet	28%	pH 6.0	0.1 M	
Holoenzima	26-28%	pH 6.0	0.1 M	Ver figura 4.1
Apoenzima	25-27%	pH 6.0	0.1 M	
AmpD-pH5.5	26-28%	pH 5.5	0.2 M	

¹La concentración del tampón fue 100 mM

²El tamaño de los cristales esta relativizado entre las distintas imágenes

4.1.2.2. Resolución estructural y refinamiento de AmpD-SeMet, holoenzima, apoenzima y AmpD complejo

Se recogió un conjunto de datos de MAD (a tres longitudes de onda) de un monocristal de AmpD-SeMet que difractó hasta una resolución de 1.8 Å. Estos datos

fueron procesados y posteriormente combinados con el programa *CAD* (*Collaborative Computational Project Number 4*, 1994) antes de iniciar el proceso de resolución estructural en el servidor *Auto-Rickshaw* (Panjikar *et al.*, 2005). El cristal de AmpD-SeMet también pertenece al Grupo Espacial $P3_2$, al igual que los cristales de la holoenzima. Los parámetros de celdilla y las estadísticas resultantes del procesamiento de los datos se muestran en la tabla 4.3. Se determinó la posición inicial de 5 átomos de selenio (de un total de 6) con el programa *SHELXD* (Sheldrick & Schneider, 1997). La ocupación de los átomos de la subestructura, al igual que las fases iniciales, fueron calculadas con el programa *MLPHARE* (*Collaborative Computational Project Number 4*, 1994). Se obtuvieron fases iniciales a 1.8 Å (el valor de la media de las figuras de mérito fue 0.66, para los datos combinados).

Tabla 4.3. Estadísticas del procesamiento de los datos y refinamiento de todas las estructuras de AmpD

Parámetros	AmpD-SeMet			Holoenzima	Apoenzima	AmpD-comp	AmpD-pH5.5
Procesado							
Grupo espacial	$P3_2$			$P3_2$	$P3_2$	$P3_2$	$P3_2$
Celdilla							
$a=b, c$ (Å)	67.7, 92.7			67.7, 92.8	68.1, 93.1	67.7, 92.8	67.98, 93.12
α, β, γ (°)	90, 90, 120			90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120
T (K)	100			100	100	100	100
	Pico	Inflexión	Remoto				
λ (Å)	0.97856	0.978910	0.918400	0.97625	0.93340	0.97627	0.872600
Resolución (Å)	1.8	1.85	1.7	2.0	1.8	1.9	2.0
¹ Nº Reflexiones	42215	39677	52405	32155	44523	31507	32782
R_{merge} (%)	8.9 (49.4)	10.1 (55.6)	10 (72.6)	11 (48.2)	12.9 (55.7)	7.2 (17.8)	9.4 (26.5)
$I/\sigma(I)$	15.9 (3.0)	11.5 (2.1)	12.4 (2.2)	23.4 (5.6)	13.7 (1.9)	13.8 (4.8)	12.9 (4.9)
Completitud (%)	95.8 (76.8)	97.7 (85.6)	100 (100)	100 (100)	99.8 (99.8)	94.4 (76.5)	100 (100)
Multiplidad	7.9 (5.4)	5.6 (4.1)	5.8 (5.7)	11.4 (11.2)	5.7 (5.4)	4.4 (2.4)	4.2 (4.2)
“Faseado”*							
Figuras de mérito	0.66						
² R_{cullis}							
Céntrica	0.0/2.17						
Acéntrica	0.0/0.93						
Refinamiento							
Resolución (Å)	58.6-1.8			35.8-2.0	36.4-1.8	58.7-1.9	46.6-2.0
R_{work}/R_{free}	0.18/0.23			0.20/0.27	0.19/0.25	0.17/0.22	0.21/0.27
Nº de átomos							
Proteína	4237			4224	4199	4310	4234
Agua	689			863	682	556	827
Ligando	-			-	-	46	-
Metales (Zn)	3			3	-	3	3
Selenio	6			-	-	-	-
Factores B (Å ²)							
Proteína	16.89			17.16	16.32	15.11	12.03
Agua	24.09			20.65	24.88	23.70	18.18
Ligando	-			-	-	32.29	-
R.M.S.D							
Enlaces (Å)	0.010			0.011	0.007	0.014	0.011
Ángulos (°)	1.116			1.195	1.049	1.121	1.115
Ramachandran**	98.0/0.0			98.2/0.0	98.6/0.17	97.8/0.19	92.2/0.21
Residuos UA	537			537	532	541	538
Código PDB	2y28			2y2d	2y2c	2y2b	2y2e
Los valores entre paréntesis corresponden a la concha de máxima resolución.							
* Estadísticas calculadas para los datos combinados por CAD							
** Favorables/No favorables							
¹ Reflexiones únicas							
² ISO/ANO							

El aplanado de solvente realizado con el programa *DM* (Cowtan, 1994), sobre los mapas previamente calculados por *RESOLVE* (Terwilliger, 2000), arrojó como resultado un mapa altamente interpretable con una excelente conectividad (correlación de $|E|^2 = 0.75$). El contenido de solvente fue refinado hasta un volumen final del 36.7%. El modelo inicial, trazado de forma automática por *ARP/wARP* (Perrakis *et al.*, 1999), comprendió el 48% del total de residuos de la unidad asimétrica. La interpretación visual de la densidad electrónica permitió el trazado manual del modelo completo, utilizando para ello los programas *O* (Jones *et al.*, 1991) y *COOT* (Emsley & Cowtan, 2004). El modelo fue refinado a una resolución de 1.8 Å, y se ajustaron los 4237 átomos correspondientes a las tres cadenas polipeptídicas que conformaron la unidad asimétrica (entre 178 y 180 residuos por monómero partiendo siempre desde la Met1). El modelo final contó además con 689 moléculas de agua y 3 átomos de Zn^{2+} . Las estadísticas finales del refinamiento se muestran en la tabla 4.3.

Posteriormente, utilizando el modelo resuelto *de novo* de la AmpD-SeMet, se resolvieron por MR las estructuras cristalinas de la holoenzima, la apoenzima, la holoenzima cristalizada a pH 5.5 (AmpD-pH5.5) y el complejo con los productos de la reacción (AmpD-complejo). En todos los casos, el procesamiento de los datos arrojó como resultado el mismo Grupo Espacial y celdilla (con variaciones no significativas), que los datos de AmpD-SeMet. Los resultados fueron excelentes para las funciones de rotación y traslación (con un buen contraste para las soluciones), lo que permitió fasear las estructuras cristalinas de todas las proteínas. El resumen de las estadísticas del procesado de los datos y posterior refinamiento de cada una de las estructuras se muestran en la tabla 4.3.

4.1.3. Análisis general de la estructura cristalina de AmpD

La superposición de todas las estructuras cristalinas de AmpD, mostró una desviación cuadrática media (RMSD) respecto los carbonos α ($C\alpha$) de 0.14 Å (figura 4.3 A), lo que implica que no existe una diferencia importante entre ellas.

Como se describió anteriormente, para la estructura resuelta por RMN (Liepinsh *et al.*, 2003), AmpD presenta un plegamiento típico de las proteínas de unión peptidoglicano (PGRPs). Este plegamiento se conserva en toda la familia amidasa₂, como la lisozima del fago T7, y particularmente en las anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasas (Cheng *et al.*, 1994; Liepinsh *et al.*, 2003; Kerff *et al.*, 2010). Así, la estructura cristalina de AmpD comprende 11 láminas β (formando tres hojas β), cinco de ellas (β_4 , β_5 , β_6 , β_9 , y β_{10}) involucradas en la conformación de la hoja β central, 4 hélices α y 4 hélices del tipo 3_{10} (figura 4.3 B y figura 4.6). La composición de la estructura secundaria se distribuye de la siguiente forma en la cadena polipeptídica: 3-5 (β_1), 7-8 (β_2), 12-14 (β_3), 23-25 ($3_{10(1)}$), 30-36 (β_4), 46-53 (α_1), 62-69 (α_2), 76-78 (β_5), 84-86 (β_6), 92-93 (β_7), 101-102 (β_8), 105-106 (β_9), 108-110 ($3_{10(2)}$), 112-118 (β_{10}), 127-143 (α_3), 145-149 ($3_{10(3)}$), 151-153 (β_{11}), 154-156 ($3_{10(4)}$), 171-177 (α_4). Dos pequeñas hojas β antiparalelas conformadas por β_1/β_2 y β_7/β_8 no se encuentran conservadas en la familia amidasa₂ (Liepinsh *et al.*, 2003).

Como detalle destacable indicaremos que no todos los enlaces peptídicos se encuentran en conformación *trans*. Las prolinas Pro40, Pro159 y Pro165 exhiben enlaces del tipo *cis*, a diferencia de la estructura de RMN. Esta última prolina, Pro165, también presenta un enlace peptídico en conformación *cis* en sus homólogos de la

lisoizima del fago T7 (Pro131), y de la anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa periplásmica de *E. coli*, AmiD (Pro162) (Cheng *et al.*, 1994; Kerff *et al.*, 2010).

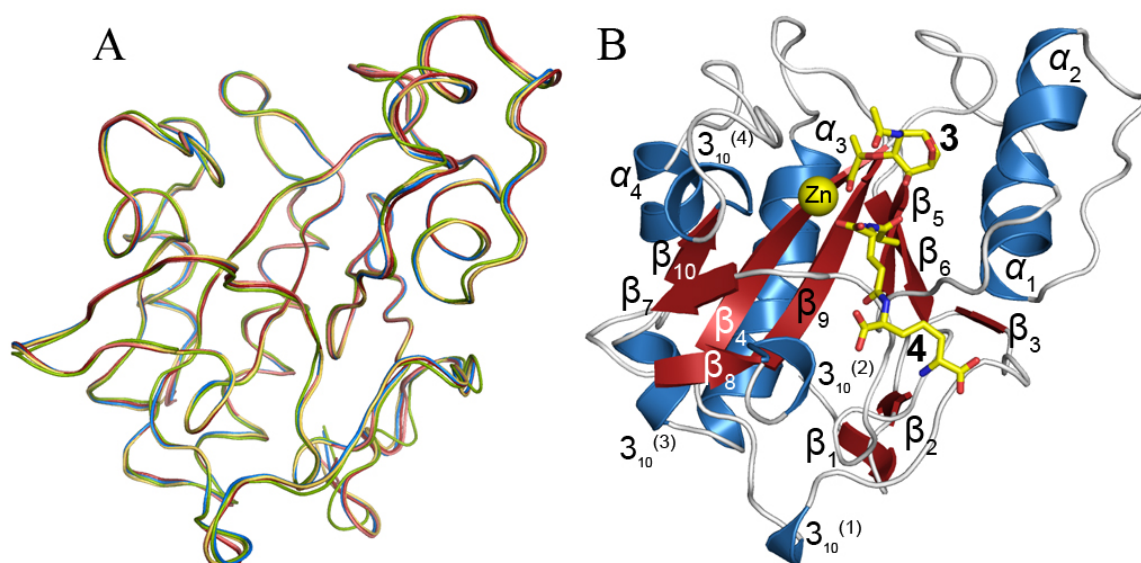


Figura 4.3. Estructura cristalográfica de AmpD. (A) Superposición de la cadena principal (carbonos α) de todas las estructuras de AmpD resueltas por cristalografía de rayos X, holoenzima (verde), apoenzima (rojo), derivado de selenio-metionina o AmpD-SeMet (rosa), holoenzima a pH 5.5 o AmpD-pH5.5 (amarillo) y el complejo con los productos de reacción o AmpD-complejo (azul). Como se puede observar en esta figura, no existen diferencias estructurales significativas entre ellas. (B) Descripción de la estructura tridimensional de AmpD en complejo con los productos de la reacción (3 y 4); las hélices α y las 3_{10} se muestran en azul, las láminas β en rojo y los bucles en blanco. En amarillo (barras) se muestran los productos de la reacción (3 y 4). La esfera amarilla corresponde al ión de Zn^{2+} .

4.1.3.1. Coordinación del Zn^{2+}

AmpD es una amidasa dependiente de Zn^{2+} . En la figura 4.4, se muestra la geometría tetraédrica de la coordinación del metal, que involucra los residuos Asp164 (1.98 Å), His154 ($N^{\delta 1}$, 2.02 Å), His34 ($N^{\delta 1}$, 2.12 Å) y una molécula de agua (2.15 Å). Estructuralmente el Asp164 se encuentra en el lazo posterior a la hélice $3_{10}(4)$, mientras que la His154 marca el inicio de esta misma hélice, y la His34 se ubica en la lámina β_4 . Los residuos, y su ubicación estructural, se encuentran altamente conservados en la familia amidasa 2. La unión de moléculas de agua (al menos una), en el poliedro de coordinación, es una característica única de complejos con iones de Zn^{2+} involucrados en catálisis, que puede ser en una conformación geométrica tetraédrica o trigonal bipyramidal (Vallee & Auld 1992a y 1992b). A este tipo de coordinación (que involucran moléculas de agua) se les denomina esfera de coordinación abierta, y su distribución (número de enlaces y distancias) depende en gran medida del pH del medio (Vallee & Auld, 1992a y 1992b; McCall *et al.*, 2000).

El ión de Zn^{2+} en el caso de AmpD, al igual que en otras hidrolasas, se encuentra directamente involucrado en la reacción como un catalizador electrofílico poderoso. Éste provee de una molécula de agua activada para el ataque nucleofílico, y polariza el grupo carbonilo del enlace escindible del sustrato, además de estabilizar las cargas negativas en el estado de transición (Vallee & Galdes, 1984; Christianson & Cox, 1999; McCall *et al.*, 2000).

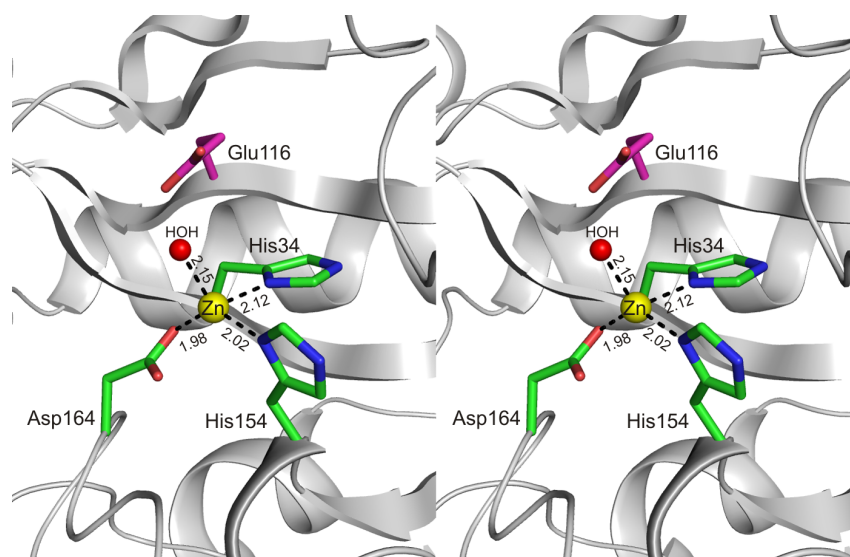


Figura 4.4. Imagen estereoscópica de la coordinación del ión metálico en la estructura de AmpD. El metal es coordinado en la estructura cristalina de la holoenzima por cuatro enlaces muy fuertes, que involucran los tres residuos de unión al metal conservados en la familia amidasa₂ (His34, His154 y Asp164), además de una molécula de agua.

La comparación del sitio de coordinación del metal en todas las estructuras resueltas de AmpD (holoenzima, apoenzima, AmpD-pH5.5 y AmpD-RMN), no muestra cambios estructurales significativos en esta región (figura 4.5). Sin embargo, se evidencian diferencias en la esfera de coordinación, que incluyen variaciones en distancias y tipo de enlaces. Así bien, las distancias de enlace son en promedio mayores en AmpD-RMN respecto de la holoenzima. El Asp164, a diferencia de la holoenzima, enlaza el Zn^{2+} a través de sus dos oxígenos, tanto en AmpD-RMN (2.23 Å y 2.28 Å) como en AmpD-pH5.5 (2.17 Å y 2.22 Å). La coordinación es muy similar en AmpD-pH5.5 y en AmpD-RMN, con la salvedad de que en esta última, no se puede observar la molécula de agua. Por su parte en AmpDpH5.5 la molécula de agua que debería completar la coordinación al metal, se encuentra a una distancia de 2.57 Å, superior a los 2.25 Å establecidos como límite para la coordinación al Zn^{2+} (McCall *et al.*, 2000).

4.1.4. Comparación entre las estructuras de AmpD resueltas por rayos X y RMN

La estructura secundaria de AmpD resuelta por rayos X no se diferenció significativamente de la estructura secundaria en solución resuelta por RMN, AmpD-RMN (figura 4.6). El número de hélices α y de láminas β se conserva entre ambas. Sin embargo existen pequeñas diferencias en cuanto al número de residuos involucrados en algunas de las láminas β (β_4 , β_9 y β_{10}) y bucles. Además, destaca la presencia de otras tres nuevas hélices del tipo 3_{10} en la estructura cristalina. La única hélice 3_{10} conservada en ambas ($3_{10}(3)$), no se compone del mismo número de residuos (figura 4.6). La superposición de las estructuras de rayos X y RMN de AmpD (figura 4.7), reveló un valor de RMSD de 3.9 Å para todos los $\text{C}\alpha$ (181). Éste representa un valor muy superior a los 0.14 Å obtenidos para la superposición de la cadena principal de todas las estructuras cristalográficas, y evidentemente, muy alto para tratarse de la misma proteína.

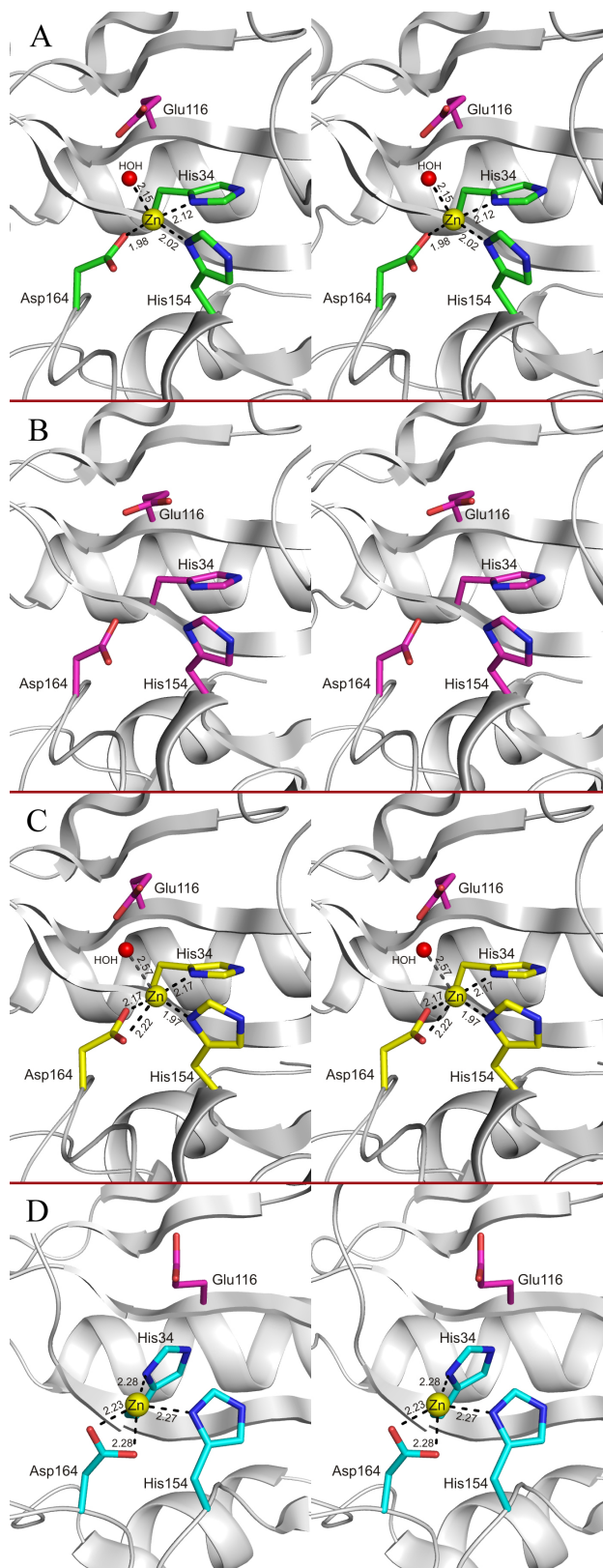


Figura 4.5. Imágenes estereoscópicas de la coordinación del ión catalítico de Zn^{2+} . (A) Holoenzima a pH 6.0; (B) apoenzima a pH 6.0; (C) estructura cristalina de AmpD a pH5.5 (AmpD-pH5.5); (D) estructura de AmpD resuelta por RMN (AmpD-RMN). En la holoenzima se observa una coordinación tetraédrica mediada por los residuos His34 e His154 (2.12 Å y 2.02 Å respectivamente), el Asp164 (1.98 Å) y una molécula de agua (2.15 Å). Mientras que en la coordinación de AmpD-RMN varían las distancias de la His34 e His154 (2.28 Å y 2.27 Å respectivamente), mientras que el Asp164 involucra ambos oxígenos (2.23 Å y 2.28 Å).

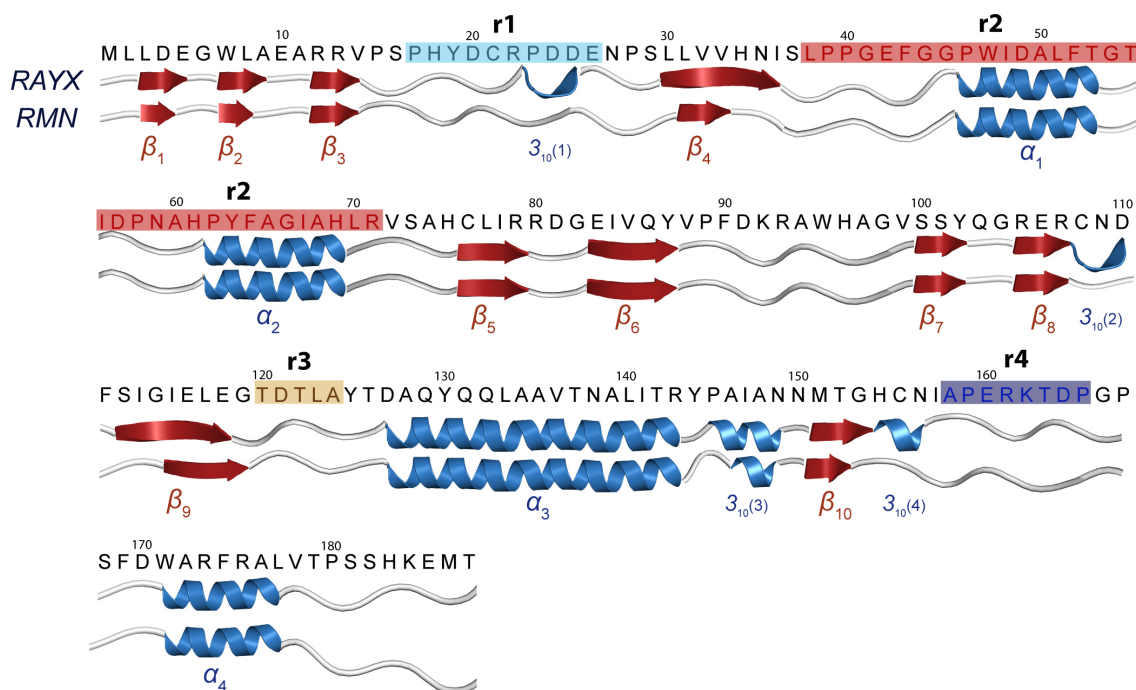


Figura 4.6. Representación esquemática de la estructura secundaria de AmpD resuelta por rayos X (RAYX) y por RMN. Todos los motivos estructurales se encuentran identificados en la figura. Los dos modelos muestran pocas diferencias a nivel de la estructura secundaria. Existe una variación en el tamaño de las láminas β 4, 9 y 10 (todas ellas más pequeñas en el modelo de RMN) y en la hélice 3_{10} (3), además existen otras tres hélices 3_{10} (1, 2 y 4) en la estructura de rayos X que no están presente en la de RMN. En la secuencia se resaltan las regiones móviles r1 (cian), r2 (rojo), r3 (marrón claro) y r4 (azul oscuro), que han sido determinadas en el análisis del RMSD entre ambas estructuras.

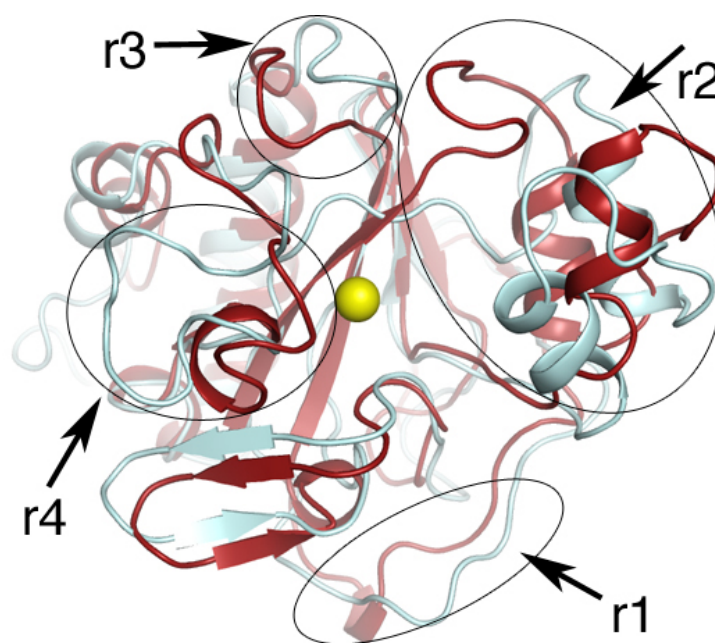


Figura 4.7. Superposición de las estructuras de rayos X (rojo) y RMN (azul). Las flechas indican las regiones que no coinciden entre ambas estructuras. La esfera amarilla representa el átomo de Zn y permite mantener la orientación y perspectiva visual de la estructura.

En un análisis detallado de la desviación cuadrática de todos los $C\alpha$ (figura 4.8), se observó que las mayores desviaciones (entre 4 y 17 Å), se concentran en cuatro regiones específicas (figura 4.7 B): r1, que comprende los residuos 17-27 ($^{17}\text{PHYDCRPDDEN}^{27}$); r2, la más larga con 37 aminoácidos, y comprende los residuos 38-71 ($^{38}\text{LPPGEFGGPWIDALFTGTIDPNAHPYFAGIAHLR}^{71}$); r3, la región de menor tamaño, definida por los residuos 120-124 ($^{120}\text{TDTLA}^{124}$) y r4 compuesta por los residuos 158-165 ($^{158}\text{APERKTDP}^{165}$). La suma de todas estas regiones comprende 60 residuos, lo que representa un tercio de toda la proteína (187 residuos). Las figuras 4.7 y 4.8 B, muestran que las regiones se encuentran alrededor del ión catalítico, y por tanto, cerca de sitio catalítico.

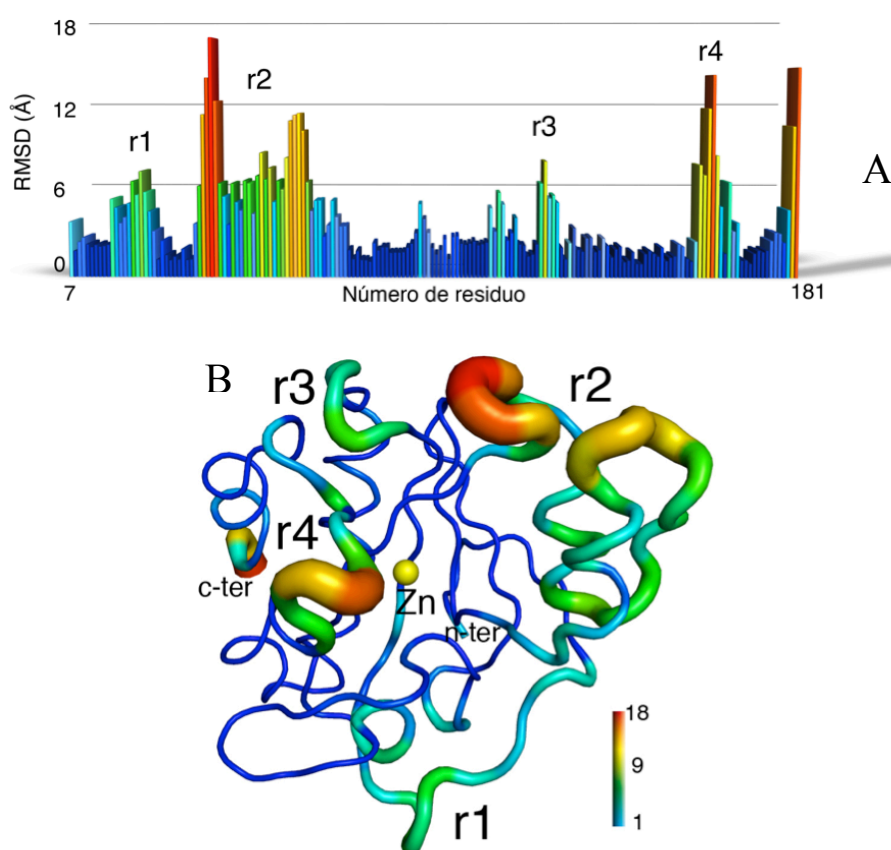


Figura 4.8. Desviaciones cuadráticas a lo largo de la cadena peptídica. (A) Este gráfico muestra la distribución de las desviaciones cuadráticas calculadas para los $C\alpha$ a lo largo de la cadena peptídica. La región r2 que posee los mayores valores (hasta 17 Å, rojo intenso), se distribuye en un par de picos que estructuralmente son adyacentes. Los colores del gráfico se corresponden con los valores en Å de la desviación, de esta forma la degradación de color que indica los valores más altos (hacia el rojo) y los más bajos (hacia el azul). (B) Representa la distribución de la desviación cuadrática en la estructura. El color mantiene el mismo patrón del gráfico, y además el grosor es directamente proporcional al valor de la desviación para el $C\alpha$ ubicado en esa posición. Así, las zonas más gruesas y rojas, indican un mayor valor, mientras que las regiones azules y delgadas revelan valores bajos.

La región r2 presenta los valores más elevados para la desviación de ambas estructuras. Específicamente la Gly41, con una desviación de casi 17 Å, representa el valor máximo y por tanto el punto de mayor desplazamiento de la cadena principal. A continuación la Arg161 (ubicada en la región r4) con 15 Å de desplazamiento, es el segundo valor más alto para los $C\alpha$. Sin embargo, los nitrógenos de la cadena lateral de este residuo, están desplazados hasta 21 Å (figura 4.9 A), lo que representa el mayor movimiento de toda la estructura, seguido de los oxígenos del Glu42 que se desplazan hasta 18 Å (figura 4.9 B).

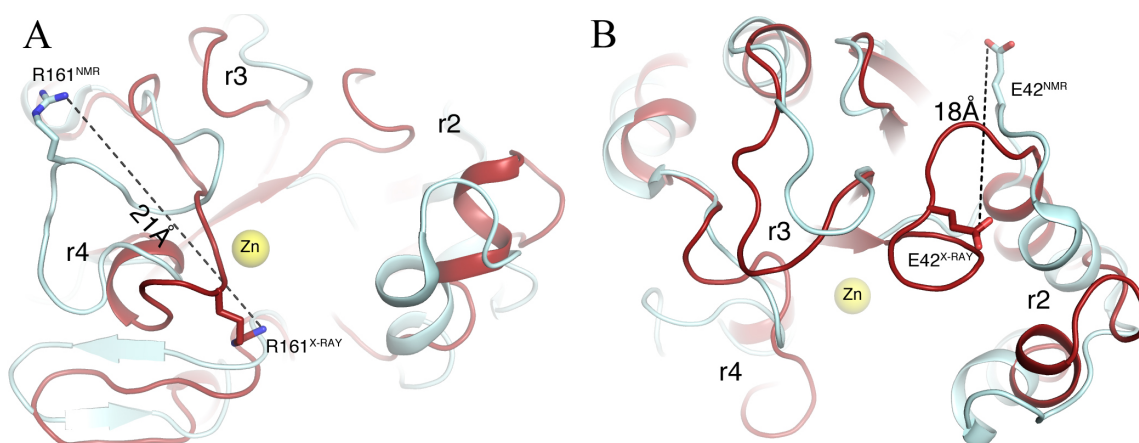


Figura 4.9. Desplazamiento de las cadenas laterales de los residuos R161 y E42 entre la AmpD-RMN (azul) y la estructura cristalográfica de AmpD (rojo). (A) La distancia de desplazamiento de los nitrógenos de la Arg161, ubicada en la región r4, es la mayor de todas las observadas en la proteína (21 Å). (B) El Glu42, es el residuo con el segundo mayor desplazamiento de la cadena lateral (18 Å).

A nivel estructural la región 1, r1, se compone de la hélice $3_{10}(1)$ y parte de los bucles que la rodean. La región r2, es la más grande y compleja, ya que incluye las hélices α_1 y α_2 , además del bucle entre ambas hélices y el lazo definido entre la lámina β_4 y la hélice α_1 . Es precisamente en este último bucle donde se definen los valores más altos de RMSD para los $C\alpha$. La región r3, comprende el lazo entre la lámina β_9 y la hélice α_3 , mientras que la región r4 se compone de parte de la hélice $3_{10}(4)$ y el bucle ubicado entre ésta y la hélice α_4 (figuras 4.6 y 4.8).

En una búsqueda de homólogos estructurales del modelo cristalográfico de AmpD, el servidor *DALI* (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/) (Holm & Rosenstrom, 2010) arrojó como resultado que la estructura más cercana es la amidasa periplásmica de *E. coli* AmiD (Kerff *et al.*, 2010), con un valor Z de 17.8 (RMSD de 1.9 Å, para 135 $C\alpha$ alineados). Le siguen, en orden decreciente de similitud estructural, la endolisina de *Bacillus subtilis* (Z: 15.5, RMSD de 2.5 Å, para 141 $C\alpha$ alineados), la endolisina PlyL del profago lamboide Ba02, codificado por el genoma de *Bacillus anthracis* (Z: 15.1, RMSD de 2.6 Å, para 143 $C\alpha$ alineados), y luego todas las PGRPs de diferentes especies, como PGRP-LE o PGRP-SA de *Drosophila melanogaster* (Z: 14.5, RMSD de 2.4 Å, para 138 $C\alpha$ alineados) o la PGRP-Ia humana (Z: 14.8, RMSD de 2.3 Å, para 135 $C\alpha$ alineados). La estructura de AmpD resuelta por RMN aparece al final de la lista de resultados en la posición 108 con un valor Z de 13.2 (RMSD de 3.5 Å, para 159 $C\alpha$ alineados).

4.1.5. Mecanismo catalítico de AmpD

4.1.5.1. Características generales del sitio de unión a PG

Se determinó la estructura del complejo cristalográfico con los productos de la reacción **3** y **4** (figura 4.10). El complejo fue obtenido por inmersión rápida de los cristales de la holoenzima con el sustrato **2**, anhMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP (figura 3.14). Este resultado confirmó la capacidad de AmpD para hidrolizar el sustrato en la conformación cristalina, y además permitió caracterizar el sitio de unión a PG de AmpD.

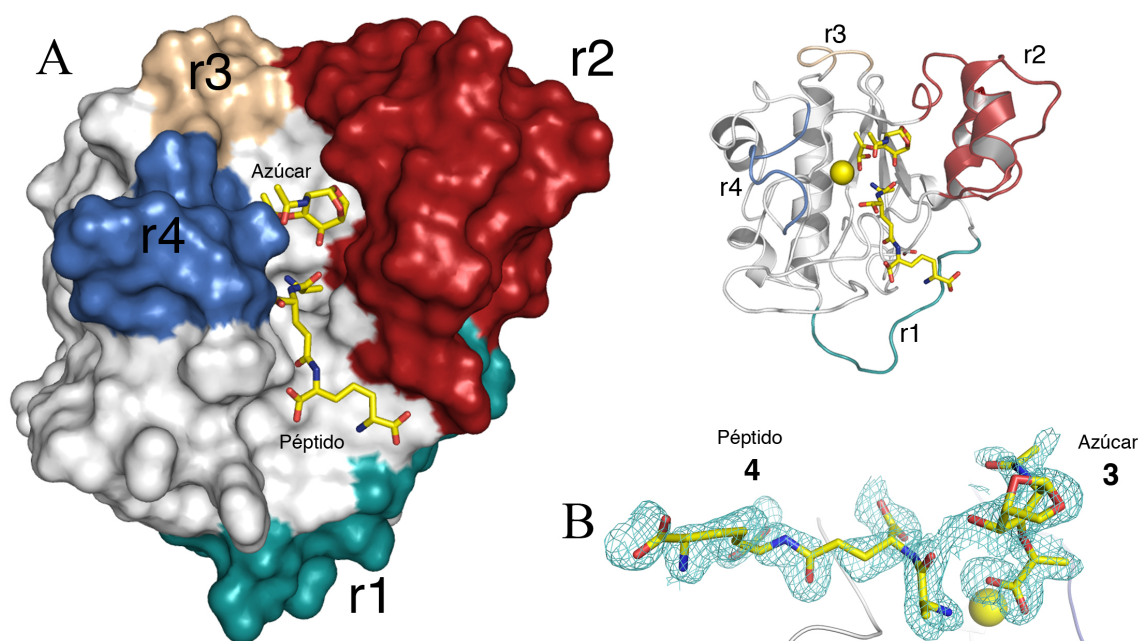


Figura 4.10. Complejo de AmpD con los productos de la reacción (AmpD-complejo). (A) En la figura de la izquierda, se observa la posición de los productos **3** y **4** (azúcar y péptido), respecto de las regiones móviles de la proteína. Cada una de las regiones está identificada por un color; r1 cian, r2 rojo, r3 marrón claro y r4 azul oscuro. Este sistema de colores se mantendrá a partir de esta figura para la identificación visual de las distintas regiones, cuando se corresponda. Los productos (**3** y **4**) definen claramente los respectivos sitios de unión del azúcar y el péptido que componen el anhMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP en la estructura de AmpD. En la esquina superior derecha del panel A, se muestra la estructura de AmpD-complejo. En ella se define la posición de los productos de reacción respecto de las regiones móviles (indicadas por color y etiquetadas) y del ión de Zn^{2+} (esfera amarilla). (B) Densidad electrónica (mapa 2FoFc , δ : 0.8) de los productos de reacción en la estructura refinada del complejo.

La estructura del complejo muestra claramente la existencia de una cavidad que permite alojar el 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil, y que define el sitio de unión al azúcar (figuras 4.10 A y 4.11 A y B). Esta cavidad posee una carga neta negativa (figura 4.11 B), característica de las regiones de unión a azúcares en las PGRPs, y una relación de volumen/superficie de acceso al solvente, calculado por *CASTp* (Dundas *et al.*, 2006), de $738 \text{ \AA}^3/394 \text{ \AA}^2$ (figura 4.11 A). El sitio de unión del azúcar conecta con un largo canal ($\approx 15 \text{ \AA}$) de carga neta positiva, en el que se encuentra unida la región peptídica del fragmento de PG, producto **4**, definiendo de esta forma el sitio de unión al péptido

(figuras 4.10 A y 4.11 B). Ambos, la cavidad y el canal, definen el sitio de unión a PG en AmpD.

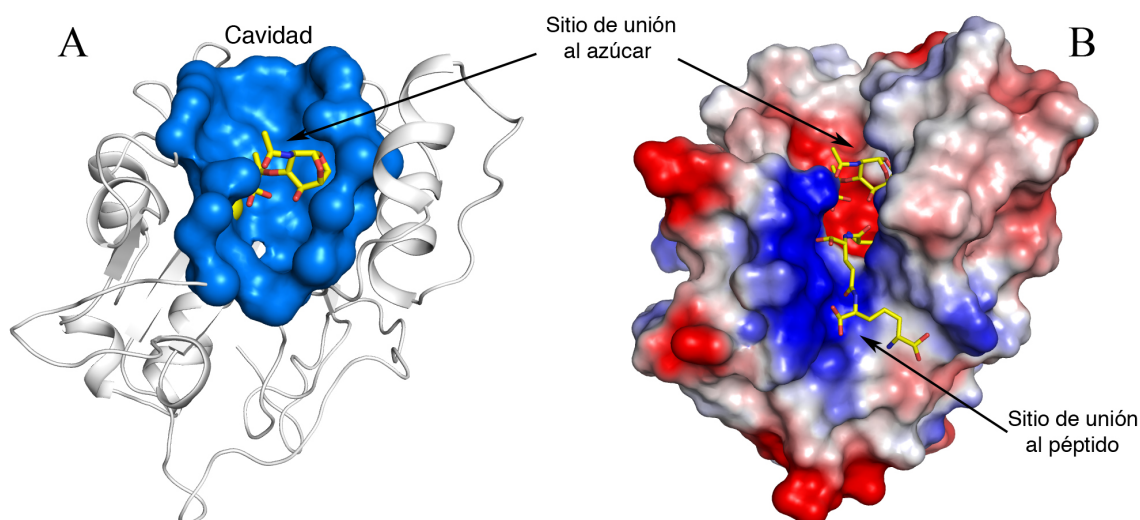


Figura 4.11. Cavidad de unión al anhMurNAc y superficie electrostática del sitio de unión a PG en AmpD. (A) Cavidad de unión al azúcar (superficie azul), en la cual se encuentra el AnhMurNAc (barras amarillas), como producto de la hidrólisis del sustrato **2** durante la inmersión de los cristales de la holoenzima. Esta cavidad posee una relación de volumen/superficie de acceso al solvente de $738 \text{ \AA}^3/394 \text{ \AA}^2$. (B) Superficie electrostática de AmpD en complejo con los productos de reacción (barras amarillas), el color rojo es indicativo de una carga neta negativa, mientras que el color azul de la superficie de la proteína, indica una carga neta positiva.

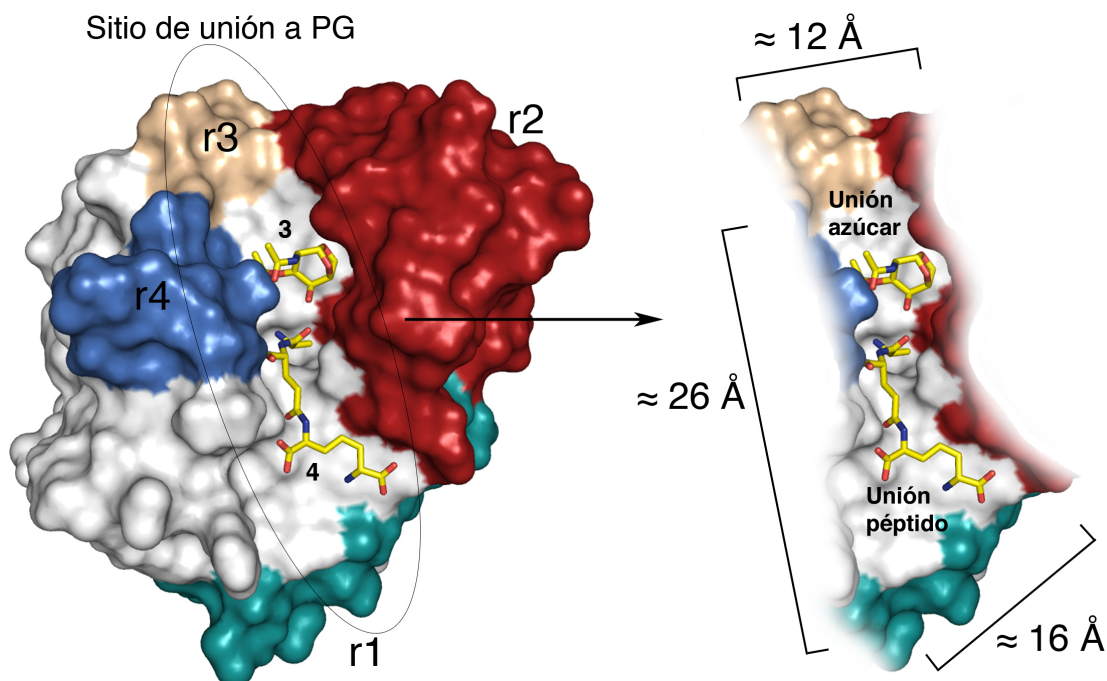


Figura 4.12. Sitio de unión a PG en AmpD-complejo. El complejo con los productos de reacción **3** y **4**, permite definir toda la cavidad de unión al peptidoglicano. Este sitio puede ser subdividido en la región de unión del azúcar (**3**) y la región de unión al péptido (**4**). Las regiones móviles se encuentran identificadas de acuerdo con el patrón anteriormente mencionado (r1 cian, r2 rojo, r3 marrón claro y r4 azul oscuro).

El sitio de unión a PG en AmpD, cuya topología general se mantiene en otras PGRPs (Kim *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005, Chang *et al.*, 2006), está formado por una larga cavidad/canal que integra las superficies de la hélice α_2 y cinco bucles definidos por las regiones entre β_3 - $3_{10}(1)$, β_4 - α_1 , α_2 - β_5 , $3_{10}(4)$ - α_4 y β_6 - β_7 . El sitio de unión del sustrato mide aproximadamente 26 Å de largo (figura 4.12), con una región más estrecha cercana al sitio activo (definido por Zn^{2+} y el Glu116) de unos 9 Å de ancho. Las regiones terminales de la cavidad se ensanchan hasta los 12 Å en el sitio de unión al azúcar, y 16 Å en el borde final del sitio de unión al péptido (figura 4.12). La principal diferencia entre el sitio de unión a PG en AmpD y el resto de las PGRPs, la constituye la región r2 completa (que incluye las hélices α_1 y α_2). Esta es estructuralmente muy diferente a la que se supone la región homóloga en el resto de PGRPs (figura 4.13). En estas, las PGRPs, existe una única hélice de mayor tamaño que sustituye a la región r2, y se encuentra estabilizada en los flancos por un par de puentes disulfuro altamente conservados (figura 4.13). También se observa que la región r1 es menos extensa en las PGRPs.

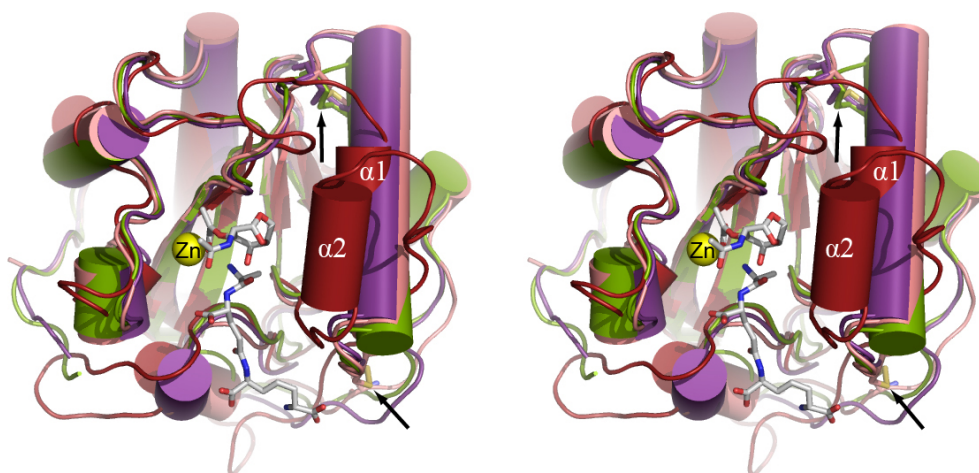


Figura 4.13. Comparación estructural de AmpD con las PGRPs. Imagen estereoscópica de la superposición de la estructura cristalina de AmpD (rojo) y algunas estructuras representativas de las PGRPs. PGRP-SD (magenta) y PGRP-SA (verde), son ambas de *Drosophila melanogaster*. PGRP-I β (salmón) es de origen humano. Los productos de la reacción 3 y 4 se encuentran representados por barras blancas (oxígenos y nitrógenos en rojo y azul respectivamente). Las flechas indican la posición de los puentes disulfuro presentes en las PGRPs, en la región equivalente a la r2 de AmpD.

4.1.5.2. Reconocimiento del peptidoglicano, detalle de la unión del sustrato y su relación con las regiones móviles

Reconocimiento del azúcar, producto 3

El producto 3 de la hidrólisis del anhMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP, se encuentra estabilizado por residuos hidrofóbicos de la cavidad definida anteriormente (figura 4.11 A). Estos residuos (Phe52, Leu51, Leu38, Val72, Ile67, Leu70) además del Glu116, conforman la superficie interna del sitio de unión al azúcar. Otros tres residuos, Tyr63, Asn35 (a través del hidroxilo de la cadena principal) y Lys162, forman puentes de hidrógeno que son críticos en la estabilización y orientación de este producto (figura 4.14). La función de estabilización de estos residuos, podría explicar la atenuación de la

actividad de AmpD causada por mutaciones sitio-dirigida de los residuos Tyr63 y Lys62 (Généreux *et al.*, 2004). Esta Lys162 es parte integral de la región r4 (figura 4.14 y 4.18) y presenta una desviación cuadrática muy alta para el $C\alpha$ de 8.5 Å. No obstante, el nitrógeno de su cadena lateral presenta un desplazamiento mucho mayor (14 Å).

Los residuos Phe52, Leu51, Leu38, Ile67 y Leu70 son, además, parte integral de la región r2 (figuras 4.14 y 4.18; tabla 4.4). Estructuralmente la Phe52 (RMSD 7.2 Å para el $C\alpha$), la Leu51 (RMSD 4.5 Å para el $C\alpha$) y la Tyr63 (RMSD 10.2 Å para el $C\alpha$) se ubican en la hélice α_1 . El extremo n-terminal de esta hélice y parte del bucle contiguo, la secuencia $^{58}\text{NNHAPYF}^{64}$ (RMSD entre 6.6 y 11.4 Å para los $C\alpha$), presenta uno de los mayores desplazamientos de toda la región r2 (figura 4.8). Así mismo, los aminoácidos Asn35 e Ile36, que se encuentran en la parte final de la lámina β_4 , ostentan la menor desviación entre los residuos involucrados en la estabilización del biciclo de azúcar. Sin embargo, la Ile36, presenta un cambio de conformero respecto de la estructura de RMN. La nueva conformación de la Ile36, permite el perfecto ajuste del anhMurNac (**3**). Además, los residuos Asn35 e Ile36, forman parte de una de la pocas regiones que despliega un cambio en la estructura secundaria, la lámina β_4 (figura 4.6), la cual se alarga precisamente hasta la Ile36.

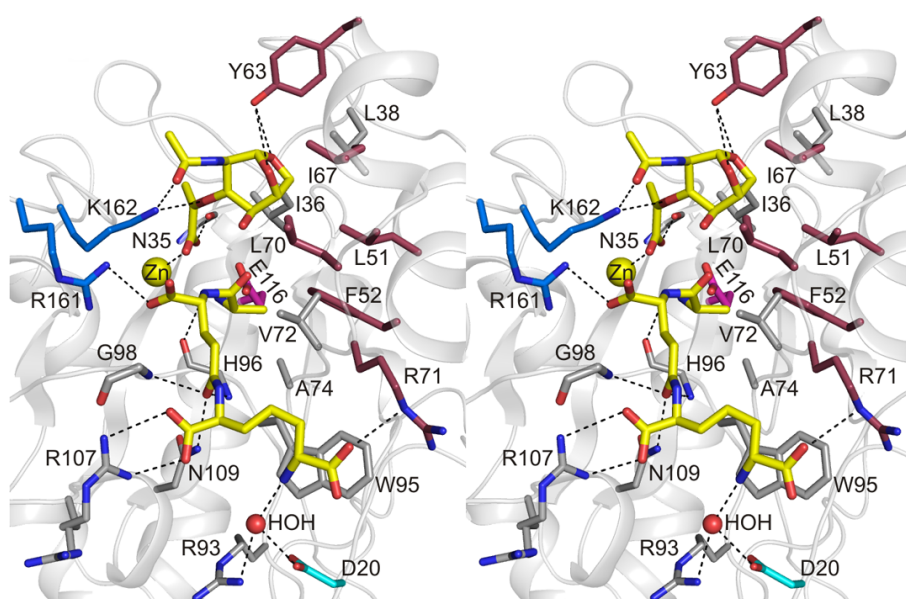


Figura 4.14. Detalle del reconocimiento del sustrato por AmpD. La figura estereoscópica muestra los residuos involucrados en la interacción y estabilización del sustrato. Los residuos están coloreados según la posición estructural respecto de las regiones móviles; de esta forma, el color rojo representa la región r2, el azul oscuro la región r4 y el cian la región r1. Al fondo en magenta se muestra el Glu116, el ácido catalítico. Los residuos de cadena lateral blanca no pertenecen a las regiones móviles. Los productos **3** (parte superior) y **4** (parte inferior) se representan en barras de color amarillo. La Arg107 presenta una doble conformación en la estructura AmpD-complejo, una de ellas (la mayoritaria con 0.6 de ocupación), coordina el péptido a través de un doble puente salino con un carboxilato del DAP.

La Tyr63 es estabilizada en su conformación activa, de interacción con el sustrato, por la Pro40 y la Ile67. El primer residuo, la Pro40, es parte de la zona con los mayores RMSD de toda la proteína, entre 7 y 16 Å para los $C\alpha$ (figura 4.8). Esta

zona está delimitada por el bucle entre la lámina β_4 y hélice la α_1 , y comprende la secuencia $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$.

Reconocimiento del péptido, producto 4

El péptido (4) está estabilizado principalmente por puentes salinos que involucran a los residuos Arg161 y Arg107. Mientras que algunos residuos hidrofóbicos como la Ala74, la Val72 y esencialmente el Trp95 proporcionan la superficie en donde se asienta la cadena principal del péptido (figura 4.14), también se observan enlaces de hidrógeno importantes en la estabilización (His96, Gly98, Asn109, Arg93, Asp20 y Arg71) (figura 4.14). La Arg107, que forma un doble puente salino con un grupo carboxilo del ácido diaminopimélico (DAP), posee una doble conformación en la estructura AmpD-complejo. Estas conformaciones se diferencian en un desplazamiento importante de la cadena lateral para interactuar con el sustrato (figura 4.14). La Arg161 (figuras 4.14 y 4.18; tabla 4.4), que forma un puente salino simple con el grupo carboxilo del residuo *D*-glutámico, pertenece a la región r4 y presenta, como se mencionó anteriormente, el mayor RMSD para la cadena lateral (21 Å, figura 4.9 A) y uno de los mayores para el $C\alpha$ (14.2 Å).

El Trp95, a pesar de no distinguirse por un movimiento significativo de su cadena principal (1.6 Å), despliega un cambio posicional importante de su cadena lateral (hasta 6 Å). Este abatimiento de la cadena lateral (figura 4.15) permite formar la base de la superficie que sustenta el péptido (figura 4.14). De forma interesante, la Arg71 interactúa con el ácido diaminopimélico a través del nitrógeno NH de su grupo guanidinio y no por los grupos aminos cargados (figura 4.14).

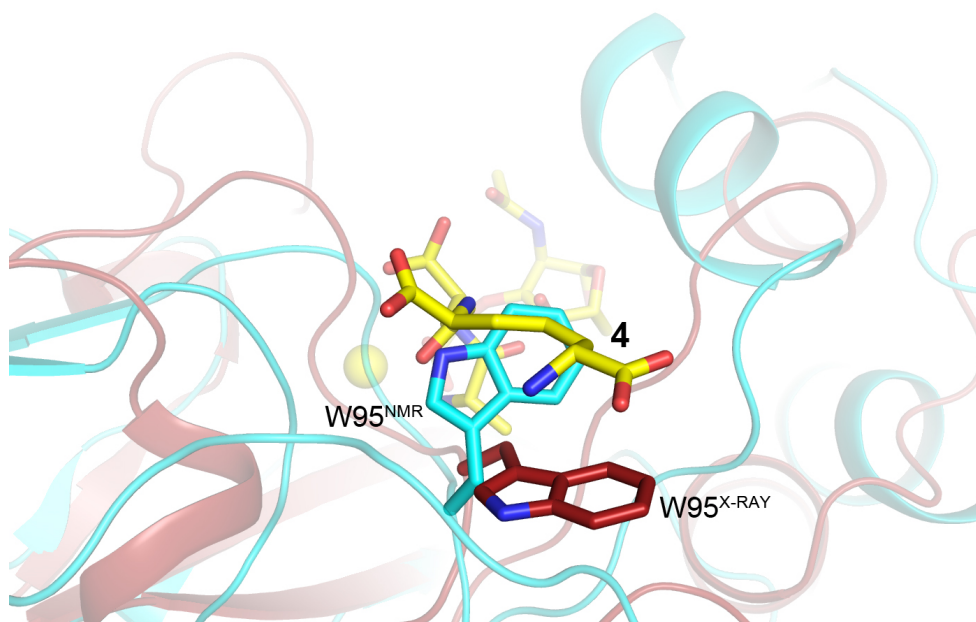


Figura 4.15. Movimiento de la cadena lateral del Trp95. El abatimiento de la cadena lateral del Trp95 entre la conformación cerrada (azul) y abierta (rojo) crea la superficie que sustenta la cadena principal del péptido (4, barras amarillas). Es evidente en esta superposición, que la conformación del Trp95 en la estructura de RMN (azul) no permitiría estabilizar el péptido.

Interacción con el Zn^{2+} y el ácido catalítico E116

El grupo carboxílico, producto del corte del sustrato, interactúa con el ión de Zn^{2+} (2.87 Å) y con el hidroxilo de la cadena principal de la Asn35 (2.3 Å). El nuevo oxígeno terminal de este carboxilato, sustituye la molécula de agua activa (HOH1), coordinada por el Zn^{2+} en la estructura de la holoenzima (figuras 4.14 y 4.16 A y B). Una segunda molécula de agua (HOH2), coordinada por el Glu116 y la molécula de HOH1 (figura 4.16 A), es sustituida por el grupo amino liberado después del corte, y que ahora forma parte del péptido (figura 4.17). En este caso, el grupo amino de la *L*-ala del compuesto **4** es estabilizado por el Glu116 a una distancia de 3 Å (figura 4.17).

El Glu116, por sus distancias al sustrato, el acceso al mismo y la coordinación del producto observada en AmpD-complejo, puede confirmarse estructuralmente como el ácido catalítico. Esto concuerda con los experimentos de mutagénesis dirigida realizados en el trabajo de Génèreux *et al.* (2004), en contraposición a la tesis propuesta anteriormente por Liepinsh *et al.* (2003). En este último trabajo se basaron en la falta de accesibilidad de este residuo al sitio de unión putativo, determinado por *docking* sobre la estructura de RMN, para descartarlo y proponer a la Tyr63 en su lugar.

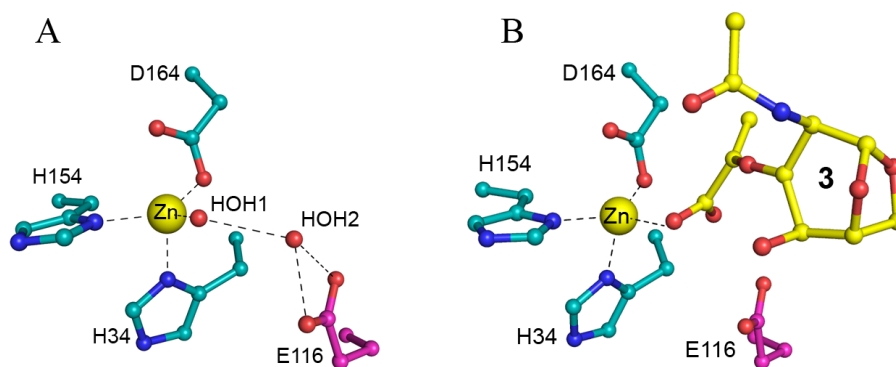


Figura 4.16. Participación del Zn^{2+} en la coordinación de la molécula de agua activada (HOH1) y el biciclo AnhMurNAc. (A) Coordinación del ión de Zn^{2+} en la estructura de la holoenzima; el metal, conjuntamente con el ácido catalítico E116, ayuda a estabilizar una red de dos moléculas de agua (HOH1 y HOH2). La molécula de agua HOH1, luego participará en el ataque nucleofílico durante catálisis. (B) Una vez hidrolizado el sustrato, el metal participa en la estabilización del carboxilato del producto **3** formado después de la hidrólisis.

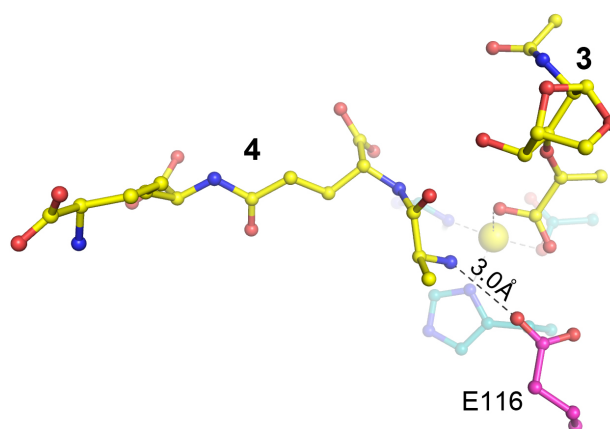


Figura 4.17. Coordinación del péptido en el sitio de la hidrólisis. El ácido catalítico E116, participa en la coordinación del grupo amino de la *L*-Ala del péptido (**4**), liberado por la ruptura del enlace escindible del sustrato **2**. Luego de la hidrólisis del sustrato, el grupo amino del péptido desplaza una molécula de agua (HOH2, figura 4.16 A), y establece un enlace (3 Å) con el ácido catalítico E116 (magenta).

La interacción del Zn^{2+} con el grupo carboxílico del biciclo AnhMurNAc, ocasiona un aumento significativo de las distancias de interacción del Asp164 con el metal, entre la holoenzima (1.96 Å y 2.6 Å) y AmpD-complejo (2.62 Å y 3.26 Å). Las interacciones de coordinación de las histidinas no presentan variaciones significativas.

En la tabla 4.4 se resumen los residuos involucrados en la coordinación del sustrato que pertenecen a las regiones móviles de AmpD.

Tabla 4.4. Residuos involucrados en la coordinación del sustrato que pertenecen a las regiones móviles

Residuo	RMSD $C\alpha$ (Å)	RMSD CL ¹ (Å)	Tipo de interacción/función	Región ²
<i>AhnMurNAc</i>				
Tyr63	10.2	9.1	Puente de hidrógeno con el biciclo	r2
Leu38	6.9	5.1	Empaquetamiento hidrofóbico	r2
Ile67	5.4	6.8	Empaquetamiento hidrofóbico	r2
Leu70	4.9	8.0	Empaquetamiento hidrofóbico	r2
Leu51	3.7	2.2	Empaquetamiento hidrofóbico	r2
Phe52	7.2	7.4	Conformación estructural de la cavidad	r2
Lys162	8.5	14.0	Puente salino con el AnhMurNAc	r4
<i>Péptido</i>				
Asp20	3.9	5.0	Puente de hidrógeno con el DAP	r1
Leu70	4.9	7.5	Empaquetamiento hidrofóbico	r2
Arg71	3.8	3.2	Puente de hidrógeno con el DAP	r2
Arg161	14.2	21.0	Puente salino simple con <i>D</i> -Glu	r4

¹RMSD calculado para el centro de masa de la cadena lateral

²Los colores de esta columna poseen el patrón de colores de las regiones móviles de AmpD

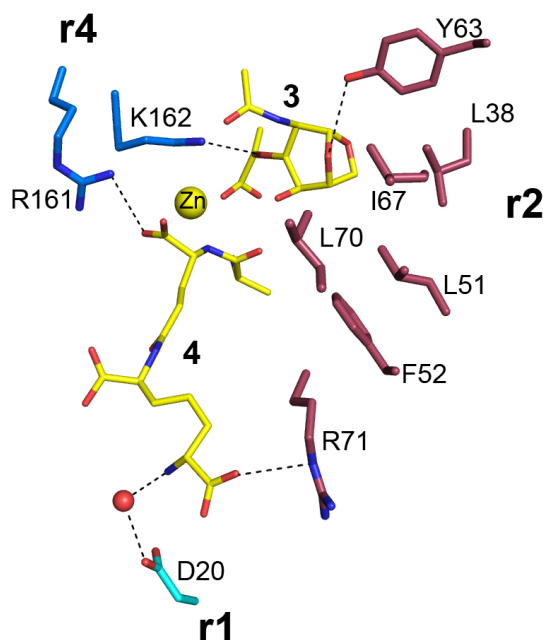


Figura 4.18. Residuos involucrados en la coordinación del sustrato y que además pertenecen a las regiones móviles. Los residuos en rojo pertenecen a la región r2, los residuos en cian (D20) a la región r1 y los residuos en azul oscuro a la región r4. Las líneas discontinuas indican las interacciones electrostáticas.

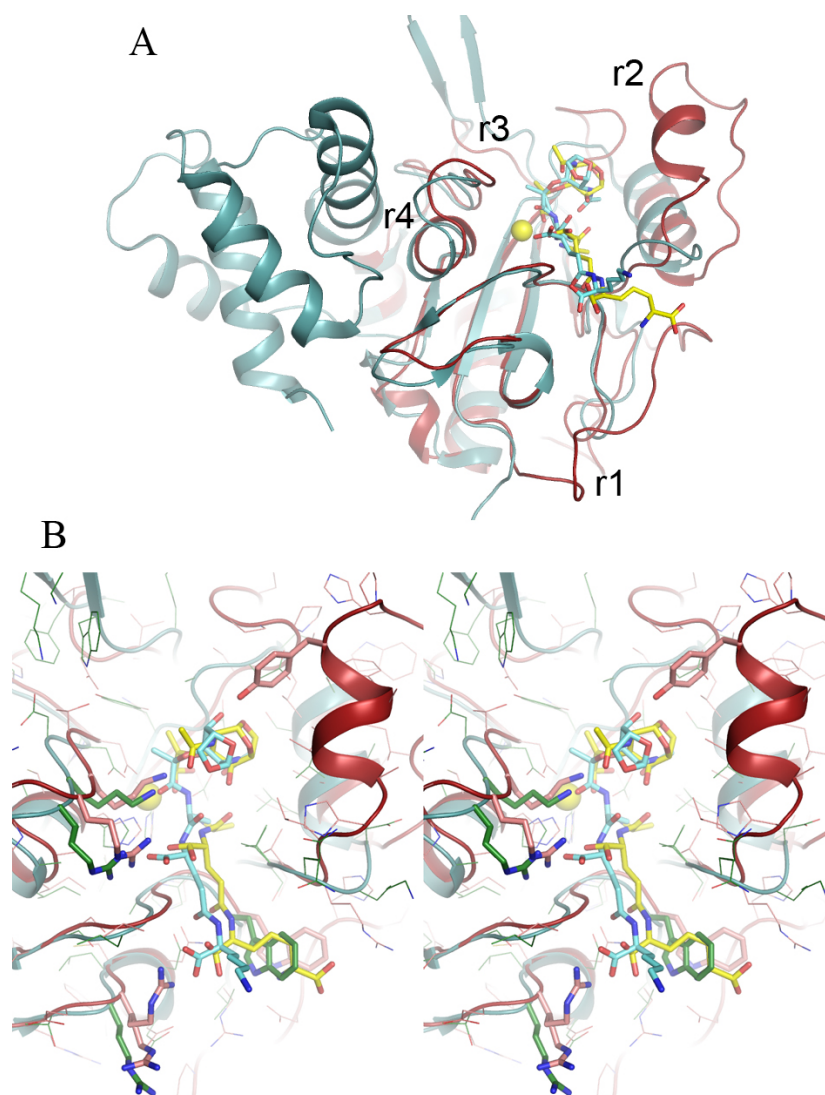


Figura 4.19. Superposición de AmpD-complejo con AmiD en complejo con su sustrato el anhMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*L*-Lys. (A) AmpD (en rojo) en complejo con los productos de reacción **3** y **4** (barras amarillas) superpuesta con AmiD (en azul claro) en complejo con su sustrato (AnhMurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-Lys, barras azules). Las regiones r1, r2, r3 y r4 están identificadas en la figura. (B) Vista estereoscópica del detalle de los residuos que estabilizan los productos (barras amarillas) en AmpD (en rojo) y el sustrato (barras azules) de AmiD (en azul). Se resaltan algunos residuos de AmiD (barras verdes) y AmpD (barras rosa) involucrados en la interacción proteína-ligando. La región r4 se encuentra en la misma conformación en ambas estructuras y además, los residuos que la componen están altamente conservados (principalmente Arg161 y Lys162). La región r2, no se encuentra presente en AmiD. El sitio catalítico más amplio de AmiD, es consistente con su actividad hidrolítica sobre el peptidoglicano, y su baja especificidad entre los compuestos **1** y **2**; mientras que AmpD se ha especializado en la hidrólisis del compuesto **2**.

Comparación de la coordinación del sustrato con la observada en AmiD

La estructura tridimensional de AmiD, una anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa periplásmica de *E. coli*, ha sido recientemente descrita en complejo con su sustrato, el anhMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*L*-Lys (Kerff *et al.*, 2010). Una superposición estructural de este complejo de AmiD, con AmpD en complejo con los productos de la reacción, revelan un patrón similar de la interacción proteína-ligando (figura 4.19). Sin embargo las regiones r2 y r3 no se conservan en esta amidasa periplásmica (figura 4.19 A). La región r4 muestra una estructura casi idéntica en ambas proteínas, e incluso,

conservan los residuos implicados en la interacción con el sustrato, Arg161 y Lys162, que mantienen la misma conformación en ambas estructuras (figura 4.19 B). La ausencia de la α_2 (donde se encuentra la Tyr63) en AmiD, crea un sitio de unión al sustrato menos restrictivo que el de AmpD. Esto es consistente con la poca especificidad de AmiD entre los compuestos **1** y **2** (Kerff *et al.*, 2010) y la especialización de AmpD por el compuesto **2** (Park, 1993; Jacobs *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1995; Génèreux *et al.*, 2004).

4.1.5.3. Comparación del reconocimiento del sustrato entre las estructuras de rayos X (abierta) y RMN (cerrada)

Una superposición del complejo de AmpD con los productos de la reacción, con la estructura previamente resuelta por RMN (figura 4.20), reveló que los compuestos **3** y **4** no podrían unirse a la conformación de AmpD obtenida por RMN. Esta conformación “cerrada” de AmpD-RMN, carece del espacio necesario (figura 4.20 B).

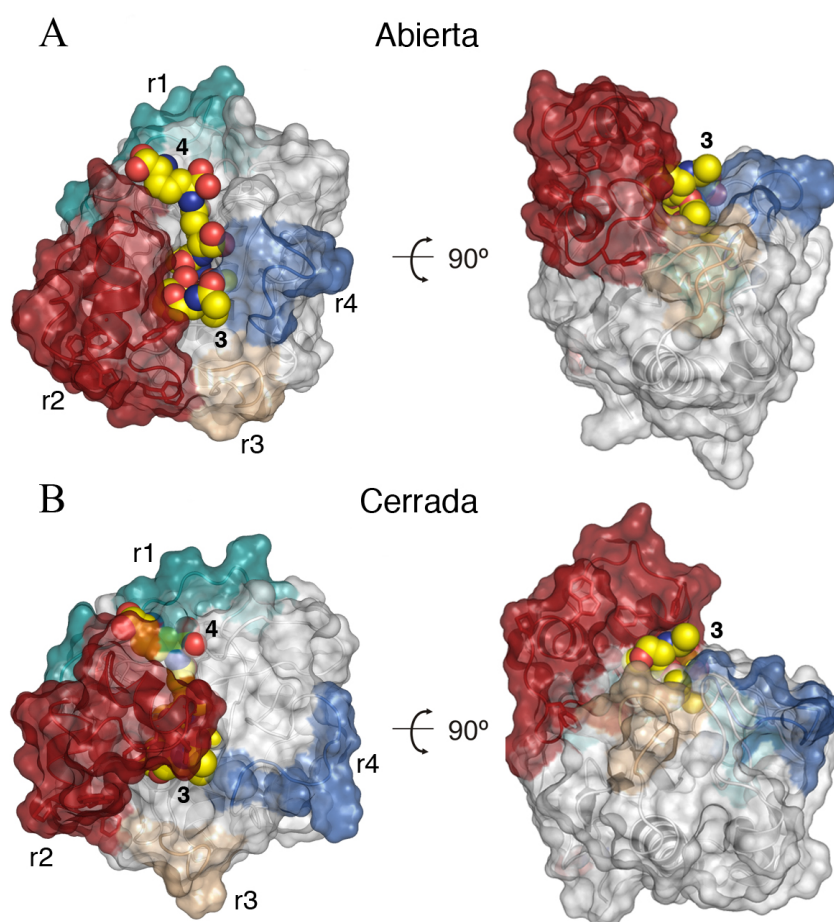


Figura 4.20. Superposición de los productos de la reacción, los compuestos **3** y **4** de AmpD-complejo (abierta) con AmpD-RMN (cerrada). (A) Superficie molecular de AmpD en complejo con los productos de la reacción (esferas). (B) Estructura de AmpD-RMN con los complejos de la reacción superpuestos. Es evidente que la estructura de RMN no posee un sitio de unión que permita la interacción con los sustratos y/o productos. Los colores sobre la superficie molecular resaltan las regiones móviles con el mismo patrón utilizado en figuras anteriores, r1 cian, r2 rojo, r3 marrón claro y r4 azul oscuro.

Gran parte del espacio ocupado por el péptido y el azúcar, en AmpD-complejo, se encuentra obstruido por la región r2 en la conformación cerrada de RMN (figura 4.20 B). Por otro lado, algunos residuos involucrados en la coordinación del biciclo de azúcar, como la Lys162, y la estabilización del péptido, como la Arg161, se ubican a más de 18 Å; de hecho, se puede observar como prácticamente la totalidad de la región r4, se distancia considerablemente de los ligandos sin ningún tipo de interacción directa (figura 4.21). La estructura de AmpD-RMN, limita de forma apreciable la accesibilidad al solvente del ácido catalítico E116. En esta conformación cerrada, es virtualmente imposible una interacción del Glu116 con el enlace escindible del sustrato, inclusive tomando en cuenta conformaciones de complejos proteína-sustrato calculadas *in silico* y reportadas anteriormente (Liepinsh *et al.*, 2003). Esto significaría que la estructura resuelta por RMN, simplemente no dispone de un sitio activo predispuesto estructuralmente para la interacción con el ligando.

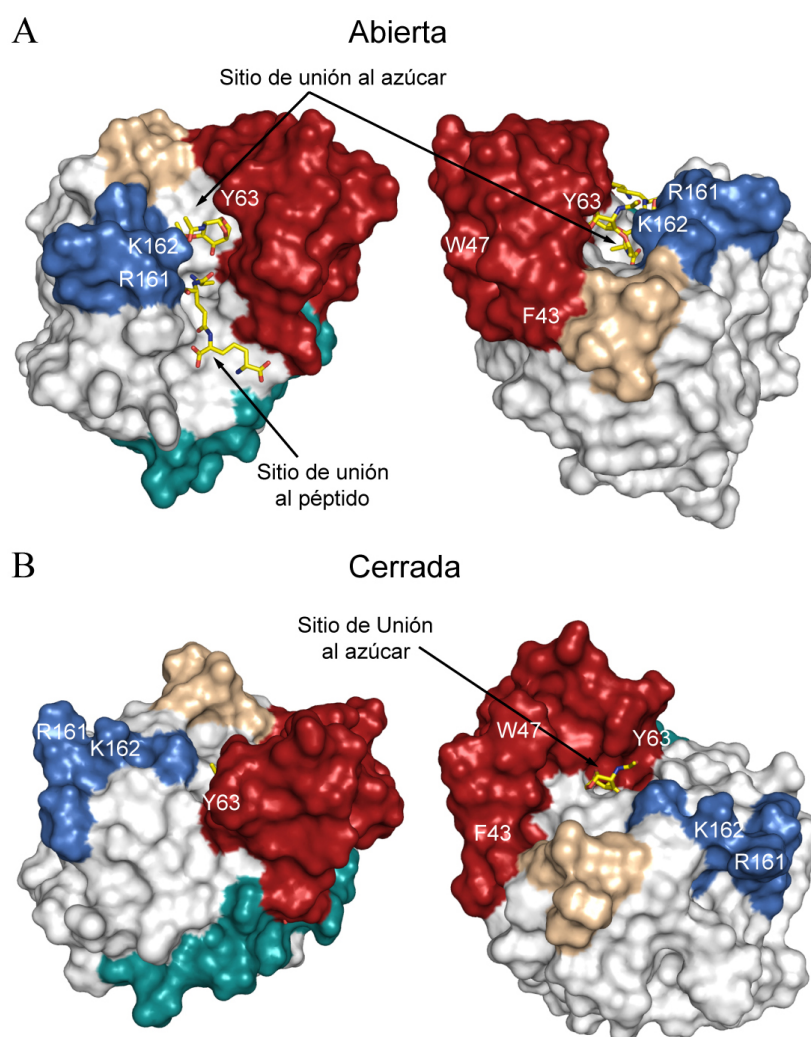


Figura 4.21. Detalle del cambio estructural de las regiones móviles r2 (rojo) y r4 (azul oscuro). (A) Superficie molecular del complejo cristalográfico de AmpD con los productos de la reacción (barras amarillas). En esta imagen, se resalta la posición de tres residuos importantes en la coordinación de los compuestos **3** y **4** (R161, K162 y Y63), y dos residuos hidrofóbicos que forman parte de la región r2 (rojo). Los sitios de unión al azúcar y péptido se encuentran indicados. (B) Superficie molecular de AmpD-RMN (conformación cerrada) en superposición con los productos de la reacción de AmpD-complejo.

En la figura 4.21, se resaltan sobre la superficie molecular de las estructuras abierta (figura 4.21 A) y cerrada (figura 4.21 B), algunos residuos involucrados en la estabilización de los productos de la reacción (K162, R161 y Y63), y otros que forman parte integral de la región r2 (W47 y F43). Todos ellos muestran de una forma clara, la existencia de cambios estructurales substanciales, a consecuencia de desplazamientos muy amplios. Estos desplazamientos permiten, últimamente, el acercamiento de las regiones r2 y r4; las cuales se encuentran virtualmente inconexas en la estructura cerrada. Todo este proceso puede ser mejor caracterizado como un evento de activación enzimática, en el cual, el modelo de AmpD resuelto por RMN constituye una conformación inactiva (ⁱAmpD), mientras que el modelo cristalográfico de esta enzima representa la conformación activa (^aAmpD).

4.1.6. El cambio conformacional entre ⁱAmpD y ^aAmpD, activación de la enzima

4.1.6.1. Cambios conformacionales y la unión del ligando

Como reveló la superposición de las estructuras AmpD-complejo y AmpD-RMN (figuras 4.20 y 4.21), esta última no puede unir y estabilizar los ligandos, ya que carece del espacio necesario para acomodarlos. Además, algunos residuos críticos en la interacción con el ligando (Y63, R161 y K162) se encuentran a distancias excesivas de hasta 20 Å. Por su parte, el Trp95 desplaza su cadena lateral hasta 7 Å, para formar la base de la superficie molecular del sitio de unión al péptido. Con este movimiento el Trp95 ocupa un espacio, en ^aAmpD, donde anteriormente (en la conformación inactiva) se establecía una red de interacciones polares importantes entre r1 y r2 (figuras 4.22 A y B).

En la forma activa, se rompe el puente de hidrógeno (3.1 Å) que el Trp95 formaba con la Asn109 (figura 4.22 A). El grupo amino de esta asparagina, libre de interacciones en ^aAmpD (figura 4.22 B), interactúa con la cadena principal del péptido (**4**) en el complejo (figura 4.22 C). El proceso de activación rompe la red de puentes salinos integrada por los residuos Arg22...Asp20...Arg71 (3.1 y 2.7 Å respectivamente). Los dos primeros residuos (R22 y D20) son parte integral de la región r1, mientras que la R71 forma parte del extremo C-terminal de la región r2. Dos de los tres residuos que conforman esta red (R71 y D20), se encargan de la coordinación del péptido en AmpD-complejo (figuras 4.14 y 4.22 C). El D20 coordina el producto **4**, a través de una molécula de agua, mientras que la R71 interactúa con el carboxilo terminal del DAP. La Arg22 se encuentra en ^aAmpD, ocluida hacia el interior de la enzima (figura 4.22 B y C).

La Arg93, en ⁱAmpD, establece un puente salino (2.8 Å) con el Asp25, siendo este último parte integral de la región r1, mientras que en la forma activa de la enzima, el Asp25 está libre y enfrentado al solvente (figura 4.22 B y C). La hélice 3₁₀(1), de la que forma parte el residuo Asp25 en ^aAmpD, no existe en la conformación inactiva (figura 4.22 A). Aunque la Arg93 no presenta una desviación cuadrática significativa entre ⁱAmpD y ^aAmpD, su cadena lateral se desplaza para coordinar al péptido a través de una molécula de agua, estabilizándolo por medio de en una pequeña red de puentes de hidrógeno en la que también participa el Asp20 (figuras 4.14 y 4.22 C).

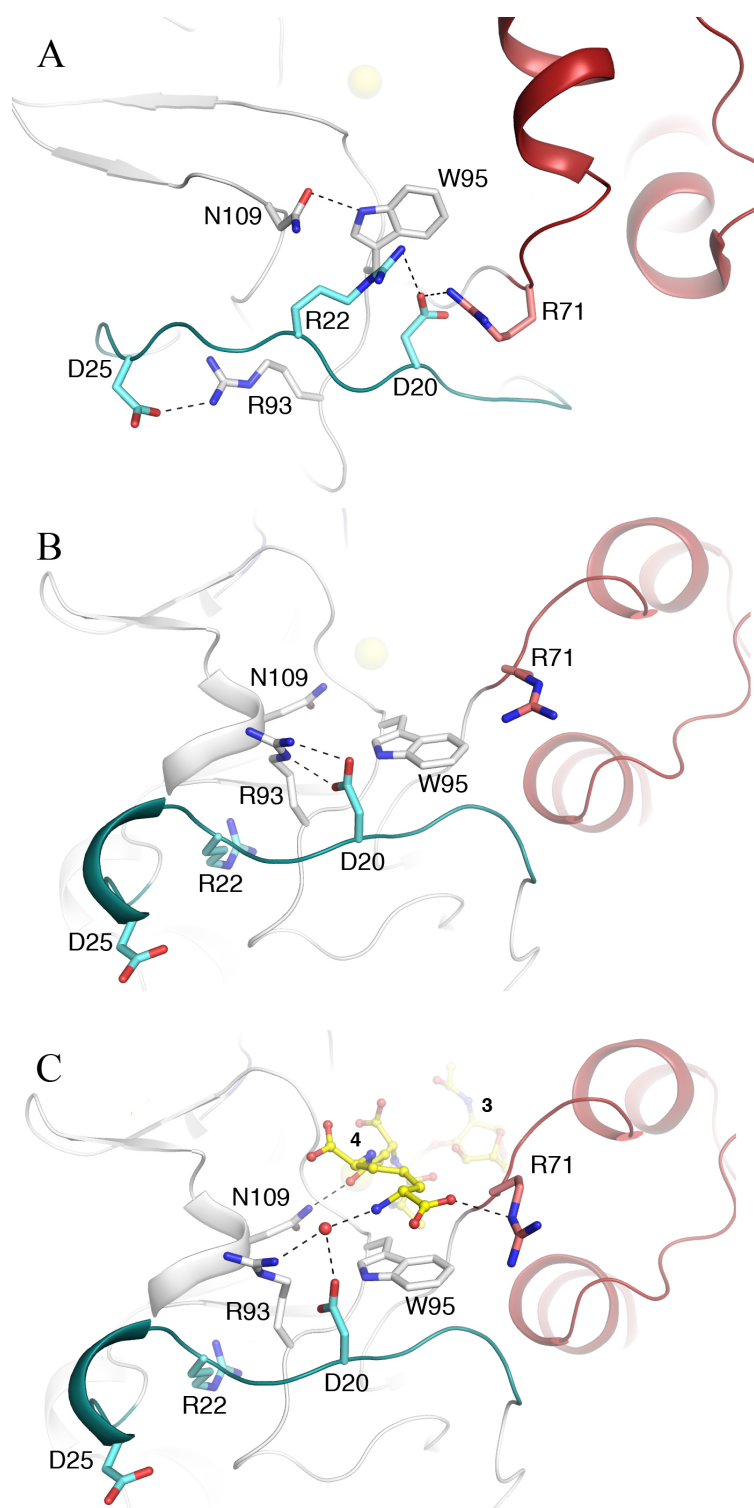


Figura 4.22. Cambios conformacionales entre ⁱAmpD y ^aAmpD relacionados con la coordinación del péptido. (A) Red de interacciones que involucra las regiones r1 (cian) y r2 (rojo), en la zona de coordinación del péptido en ⁱAmpD. (B) Red de interacciones que involucra las regiones r1 (cian) y r2 (rojo), en la zona de coordinación del péptido en ^aAmpD. (C) Red de interacciones durante la coordinación de los productos (barras amarillas) en AmpD-complejo.

Los movimientos de los residuos Arg161 y Lys162 (pertenecientes a la región r4), durante el proceso de activación, no rompen ningún tipo de interacción

electrostática en ⁱAmpD. Estos residuos, inicialmente expuestos al solvente en la conformación inactiva, estabilizan al péptido (R161) y al biciclo sacárido (K162) en ^aAmpD (figuras 4.14 y 4.18). La cadena lateral de la Arg162 despliega el mayor movimiento observado para las cadenas laterales (figura 4.9 A).

La región r4 pivota sobre el ión metálico (Zn²⁺) a través del Asp164. Este residuo es el único de dicha región, que no modifica sustancialmente su posición en el proceso de activación (figura 4.23). Esto sucede por su papel como coordinador del Zn²⁺. No obstante, dicho aminoácido forma parte de la región r4, ya que los residuos anteriores (¹⁵⁸APERKTD¹⁶⁴) y el posterior a su posición (P165), se desplazan de forma significativa, cambiando la colocación de este bucle (figura 4.23). Por su parte, la Pro165 cambia la configuración de su grupo amina de *trans* a *cis* entre la conformación inactiva y activa respectivamente. Además, estructuralmente se observa un intercambio posicional entre la Thr163 y dicha prolina, invirtiendo de esta manera, la configuración del bucle alrededor del Asp164 (figura 4.23).

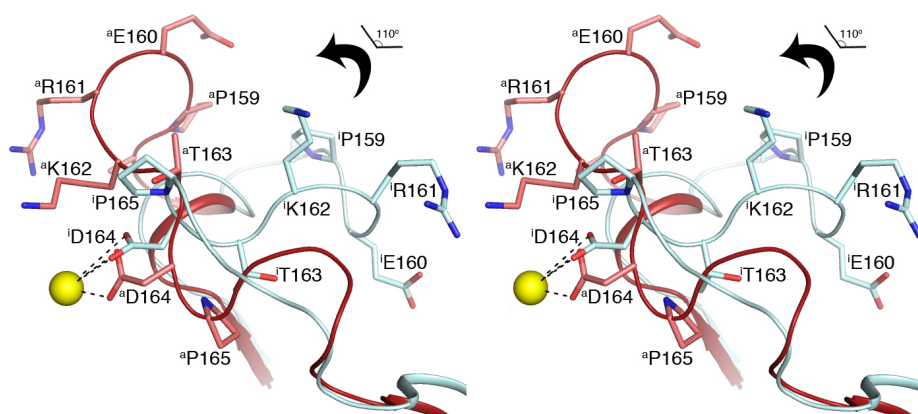


Figura 4.23. Imagen estereoscópica del desplazamiento de la región r4 entre ⁱAmpD (azul) y ^aAmpD (rojo). La región r4 parece pivotar sobre el anclaje molecular al ión metálico. El residuo Asp164, que forma parte integral de la región, es también el ácido encargado de completar la coordinación del Zn²⁺ (esfera amarilla). La Lys161 y Arg162, se desplazan hasta 20 Å para coordinar el azúcar y el péptido respectivamente. Todo el bucle se traslada con un desplazamiento aproximado de 110° alrededor de un eje que imaginario que pasa por el Asp164 de forma perpendicular a la imagen.

A pesar de que el movimiento de la región r2, prácticamente da forma a la cavidad de unión del biciclo, únicamente la Tyr63 como parte de la región, establece un puente de hidrógeno con el AnhMurNAc (figuras 4.14 y 4.18). El resto de los residuos de la misma, involucrados en la estabilización de los productos, forman parte de un reajuste complejo que incluye residuos hidrofóbicos voluminosos, como la Phe43 y el Trp47, con desplazamientos importantes (figura 4.21).

4.1.6.2. La secuencia ³⁹PPGEFGGP⁴⁶

Los mayores cambios están condensados en la región 2, con un RMSD de 7 Å para los 33 Cα que la conforman (figura 4.8). Esta región comienza con una secuencia, ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ (figura 4.24), que concentra el mayor RMSD de toda la proteína. Dentro de esta secuencia se encuentra el ácido Glu42, cuya cadena lateral se desplaza hasta 18 Å (figura 4.9 B), representando el segundo mayor movimiento observado. Los primeros dos residuos, Pro39 y Pro40, cambian la configuración de su grupo amina de

cis a *trans* y de *trans* a *cis* respectivamente, durante la transición del estado inactivo al activo.

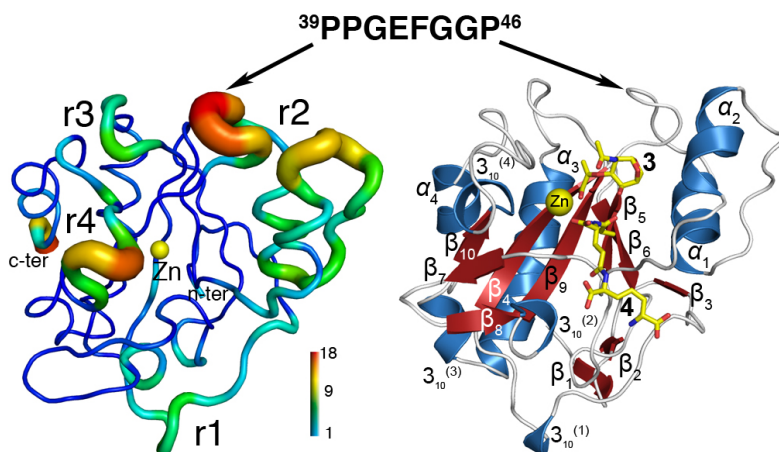


Figura 4.24. Ubicación del bucle $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$ en $^{\text{a}}\text{AmpD}$. En la imagen de la izquierda se observa que el bucle formado por la secuencia $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$, posee los mayores RMSD para los $\text{C}\alpha$, de toda la proteína. En la imagen de la derecha, se aprecia la ubicación de la secuencia en la estructura de $^{\text{a}}\text{AmpD}$, entre la β_4 y la hélice α_1 . Además, el bucle se empaqueta estructuralmente entre la hélice α_2 y la región r3.

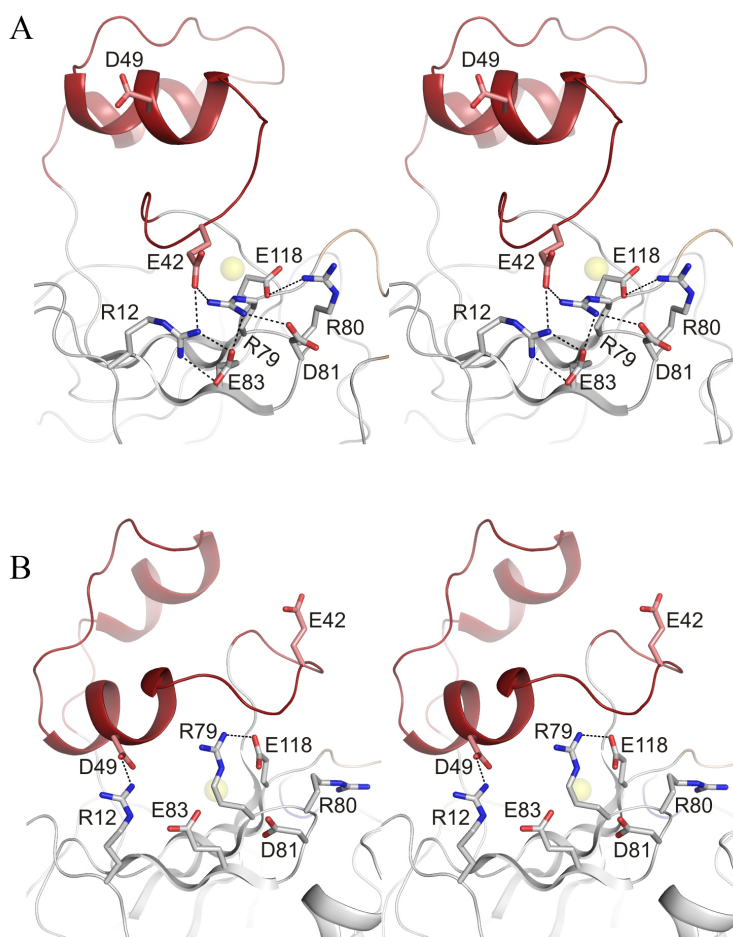


Figura 4.25. Reestructuración de la red de puentes salinos entre las conformaciones activa e inactiva. (A) Red de puentes salinos en la conformación inactiva. En ella se observa el papel fundamental del Glu42, como parte de la red. (B) Conformación de la red electrostática en el modelo activo de AmpD. Existe una ruptura general de las interacciones de la red. El ácido Glu42 se libera de la redⁱ, mientras que el ácido Asp49, anteriormente libre en $^{\text{i}}\text{AmpD}$, forma parte de una nueva red menos compleja en $^{\text{a}}\text{AmpD}$.

Además, y como se mencionó anteriormente, la Gly41 exhibe el mayor RMSD observado para los Ca (17 Å). La región r2, es única entre todas las estructuras tridimensionales pertenecientes a la familia amidasa_2 reportadas hasta la fecha.

Aún más interesante es el papel del ácido Glu42 en el cambio conformacional de AmpD. Éste forma parte de una red, fuerte y compleja, de puentes salinos que estabiliza el bucle $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$, y por tanto la región r2. Esta red funciona como ancla del ácido Glu42, y consecuentemente de la región r2, en $^i\text{AmpD}$ (figura 4.25). La red de puentes salinos en la conformación inactiva (redⁱ), incluye los residuos Arg12, Glu83, Arg79, Asp81, Glu118 y Arg80 (figura 4.25 A), todos ellos con interacciones muy fuertes (distancia promedio menor a 3 Å). Las argininas de esta red conforman un parche básico muy expuesto (figura 5.3), que incluye también a la Arg13. De forma llamativa, la redⁱ se rompe en $^a\text{AmpD}$ (figura 4.25 B). El ácido Glu42, es liberado y se expone al solvente. En su lugar el Asp49 interactúa con la Arg12, en una posición estructural cercana a la anteriormente ocupada por el mismo Glu42. El resto de interacciones (al menos 4) se rompen, y sólo se mantiene un enlace entre la Arg79 y el Glu118. En términos estructurales, la hélice α_1 parece desplazarse ocupando la posición que el bucle $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$ mantenía en $^i\text{AmpD}$, mientras que este último, se mueve a una nueva posición entre la región r3 y la hélice α_2 , rompiendo la gran mayoría de las interacciones electrostáticas.

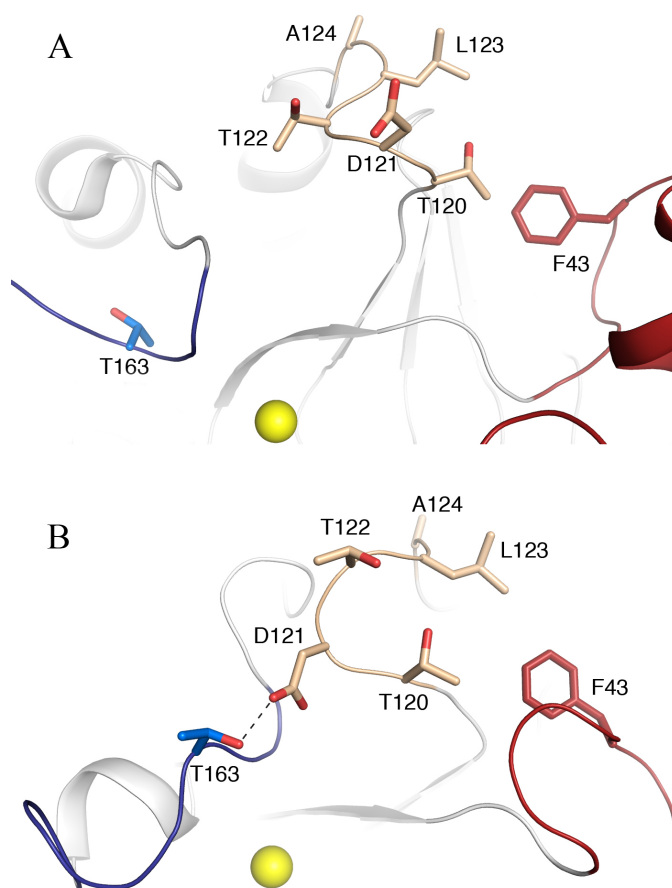


Figura 4.26. Cambio de la región r3 en el proceso de activación. (A) Estructura de la región r3 en la conformación inactiva de AmpD. En esta conformación r3 no interactúa con las regiones r2 y r4. (B) Estructura de la región r3 en la conformación activa de la enzima. En la conformación activa la región r3 engancha a las regiones r2 (por interacción con la F43) y r4 (a través de un puente de hidrógeno entre D121 y T163).

4.1.6.3. La región r3

La región r3, la menos extensa con 5 residuos, también presentó cambios destacables relacionados con la estabilización de la conformación activa (figura 4.25). En ⁱAmpD, el bucle ¹²⁰TDTLA¹²⁴ (r3) parece no interactuar de forma directa con las regiones r2 y r4 (figura 4.26 A). Únicamente se aprecian contactos leves entre los residuos Thr120 y Phe43. Sin embargo, una vez activada la enzima, se forma un puente de hidrógeno (2.5 Å) entre el hidroxilo de la Thr163 (región r4) y el ácido Asp121 (figura 4.26 B). De esta forma, la región r3 se ha desplazado hacia la región r4, por efecto del movimiento de bucle ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ (r2). La Phe43 está empaquetada en ^aAmpD, por la Thr120 y la Leu123 (figura 4.26 B). El desplazamiento general de la región r3, permite de este modo mantener la conformación activa de la enzima enganchando ambas regiones, a r2 a través de la Phe43 y r4 por medio del puente de hidrógeno. El movimiento de la región r3 conecta espacialmente en ^aAmpD, dos regiones aparentemente inconexas en la estructura inactiva.

4.1.7. La transición conformacional entre las estructuras inactiva y activa, estudio por TMD

La transición entre los estados inactivo y activo de la enzima se exploró a través del método de TMD (del inglés *Targeted Molecular Dynamics*). Esta exploración reveló una ruta plausible, para la transformación entre las dos conformaciones (Figura 4.27 y video 1). En los primeros 0.5 ns, se sucede un reordenamiento vertiginoso de las hélices α_1 y α_2 (r2), acompañado de cambios conformacionales de la región r4, el bucle comprendido entre la lámina β_{10} y la hélice α_1 (figura 4.16 B). El rápido movimiento en forma de bisagra de la región 2, implica una oscilación drástica de las hélices α_1 y α_2 . Este movimiento, a su vez, induce cambios conformacionales del bucle ³⁹PPGEFGGP⁴⁶, particularmente un desplazamiento del residuo hidrofóbico Phe43 (en 0.5 ns), el cual se expone en mayor grado al solvente en la conformación activa. La Phe43 exhibe en este proceso, una flexibilidad considerablemente mayor que el resto de la proteína. Este hecho se soporta notablemente con el alto factor de agitación atómica (factor B), que muestra en todas las estructuras resueltas por rayos X. Además parece jugar un rol transcendental durante la transición conformacional (≈ 1 ns), “desplazando” al Glu42 fuera de la red de enlaces salinos fuerte (redⁱ), en la que interactúa directamente con las argininas 12 y 79 (R12 \cdots E42 \cdots R79). El aumento de las distancias entre E42 \cdots R12 y E42 \cdots R79 (figuras 4.24 y 4.26 A), muestra cómo la cadena lateral del Glu42 es desplazada de forma vertiginosa (≈ 1 ns) desde su posición en ^aAmpD, después de romperse la interacción con el guanidinio de la Arg12. A continuación, el Glu42 se disocia totalmente de la red con la ruptura, en última instancia, del enlace que formaba con la cadena lateral de la Arg79. Además, durante este desplazamiento que rompe la red, parece formar una interacción transitoria con la Arg80. La ruptura final de esta fuerte red electrostática, libera al bucle ³⁹PPGEFGGP⁴⁶, que con su amplio movimiento desplaza a la región r3.

Por otra parte, la Tyr63, que parece estar secuestrada en una pequeña cavidad cercana al Zn²⁺ (a una distancia de 6 Å), llega a moverse hasta 16 Å lejos del metal, hasta finalmente posicionarse a los 11 Å que muestra en la conformación activa (video 2). La transición al estado activo, se llevó a cabo en la primera mitad del período de simulación.

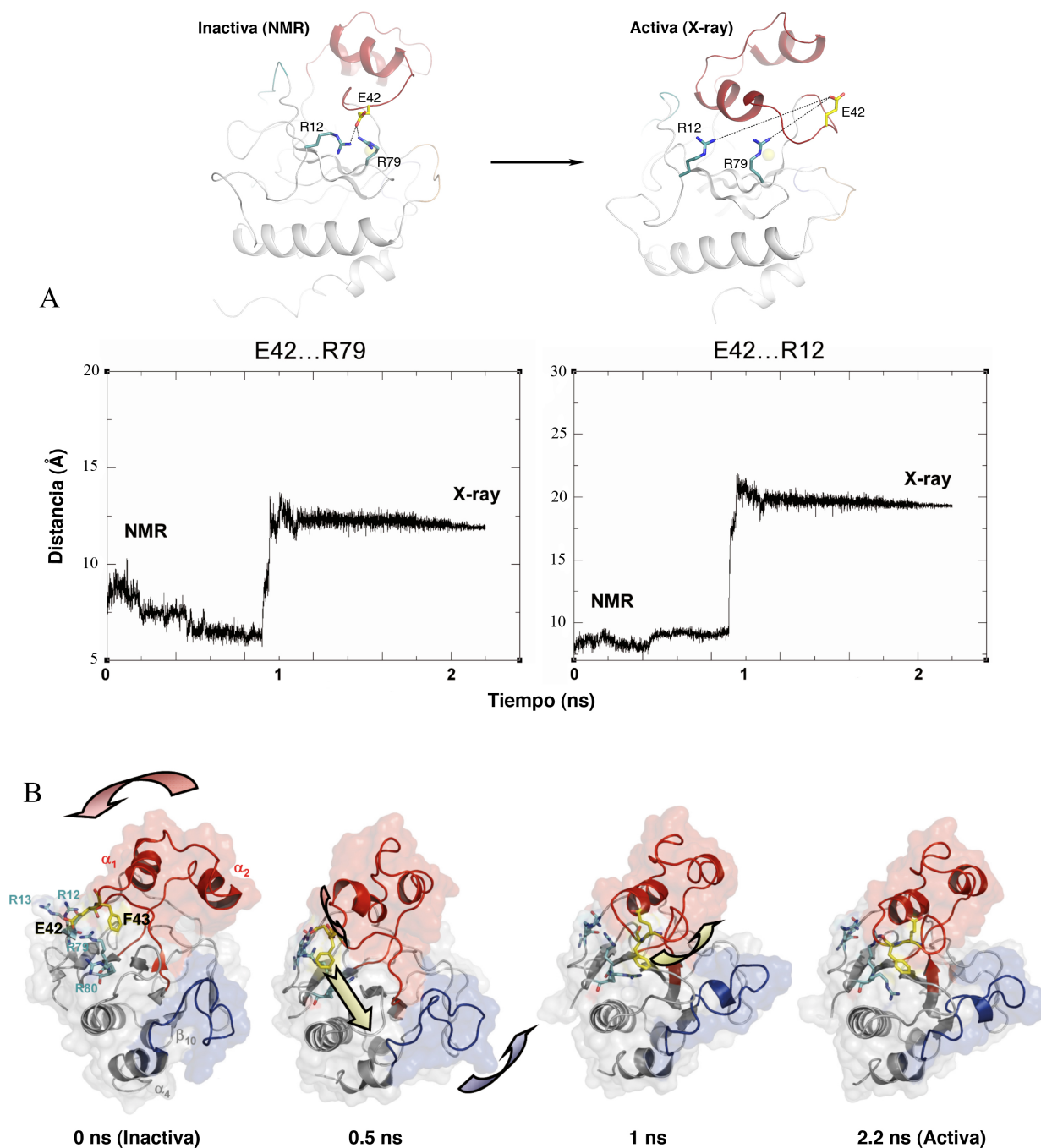


Figura 4.27. Cambios conformacionales observados en AmpD durante la simulación por TMD, yendo desde la conformación inactiva (RMN) a la conformación activa (rayos X). (A) Variación de las distancias entre centros de masas, en función del tiempo de simulación, calculado para las interacciones entre E42...R79 (gráfico de la izquierda) y E42...R12 (gráfico de la derecha). (B) Imágenes tomadas durante la simulación por TMD que muestran los principales pasos en la secuencia de los eventos de cambio conformacional. En los primeros 0.5 ns, se observan arreglos locales drásticos en los que intervienen las hélices α_1 y α_2 de la región r2 (rojo), acompañados por cambios conformacionales en la región r4 (azul). El movimiento de la región r2 involucra un movimiento rápido de ambas hélices (α_1 y α_2) que posteriormente induce el desplazamiento del bucle $^3\text{PPGEFGGP}^{46}$. El movimiento de este bucle, (0.1 ns), se sucede con la salida del E42 de la red de enlaces salinos. En esta ruptura de la red, F43 parece jugar un papel importante durante la transición “empujando” fuera al ácido E42.

4.1.8. Efecto del pH en las estructuras de AmpD. Relación entre el cambio conformacional y la coordinación al Zn^{2+}

La presencia del sustrato parece no ser responsable de la activación de la enzima, ya que todas las estructuras cristalográficas de AmpD mostraron la misma conformación activa (figura 4.3 A). Dado que el pH de las condiciones experimentales es una de las diferencias entre las estructuras de RMN y las estructuras cristalográficas, se estudió el efecto de este parámetro a través de varias aproximaciones.

Inicialmente se realizó una inmersión de los cristales de la holoenzima (tamponada a pH 6.0), en la condición de cristalización tamponada a pH 5.5 (el pH de la condición de experimentación de RMN). Como resultado, no se observó ningún cambio macroscópico apreciable en la calidad de los cristales. En segundo lugar, se obtuvo éxito en la mejora de los cristales que crecieron, inicialmente maclados, en la condición de cristalización número 93 de JCSG (tabla 4.0), pero manteniendo el pH a 5.5. La estructura AmpD-pH5.5 mostró diferencias, aunque no comparables a las observadas entre la estructura de rayos X y la obtenida por RMN. El RMSD (0.36 \AA para todos los $\text{C}\alpha$) calculado entre AmpD-pH5.5 y la holoenzima es superior al de la superposición de todas las estructuras cristalográficas restantes entre sí, holoenzima, apoenzima y AmpD-complejo (RMSD de 0.10 \AA), y las diferencias se concentran en las regiones relacionadas con el proceso de activación (figura 4.28).

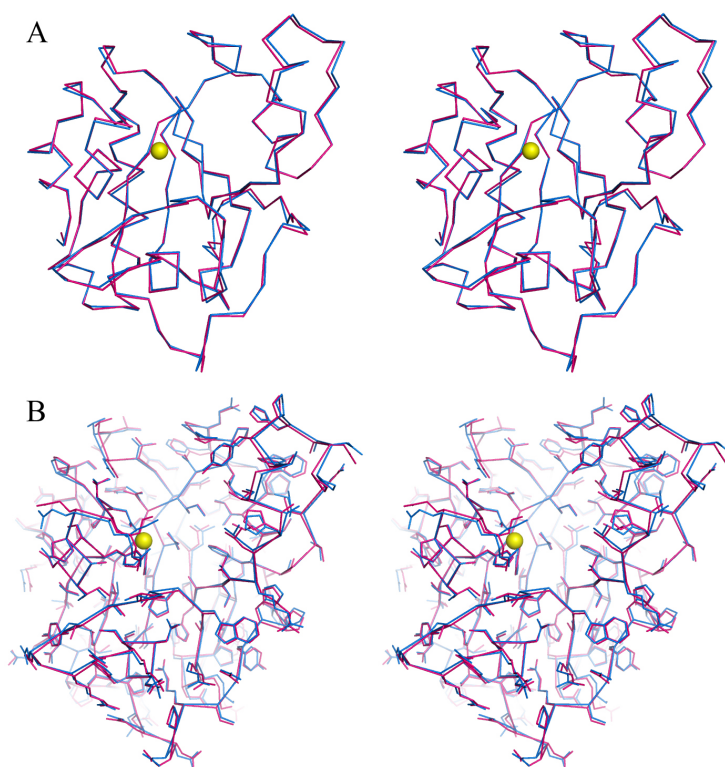


Figura 4.28. (A) Imagen estereoscópica mostrando la superposición de la cadena principal de la holoenzima a pH 6.0 (azul) y a pH 5.5 (magenta). (B) Imagen estereoscópica mostrando la superposición de la cadena principal, incluyendo las cadenas laterales, para las mismas estructuras.

Por último, la coordinación del ión metálico en la estructura cristalizada a pH 5.5, fue similar a la coordinación observada en la estructura de RMN. En ambas participan los dos oxígenos del Asp164 en la primera esfera de coordinación (figura 4.5 C y D).

4.1.8.1. Espectroscopía de absorción de rayos X extendida, EXAFS

Para explorar a mayor profundidad la relación entre el pH, la coordinación al metal y la estructura de AmpD, se realizaron ensayos de espectroscopía de absorción de rayos X extendida, EXAFS (del inglés *Extended X-ray Absorption Spectroscopy*), utilizando muestras cristalinas y en solución a diferentes valores de pH (ver materiales y métodos). Esta técnica da información sobre la estructura geométrica y las características electrónicas cercanas al átomo con capacidad de absorción, en este caso del Zn^{2+} .

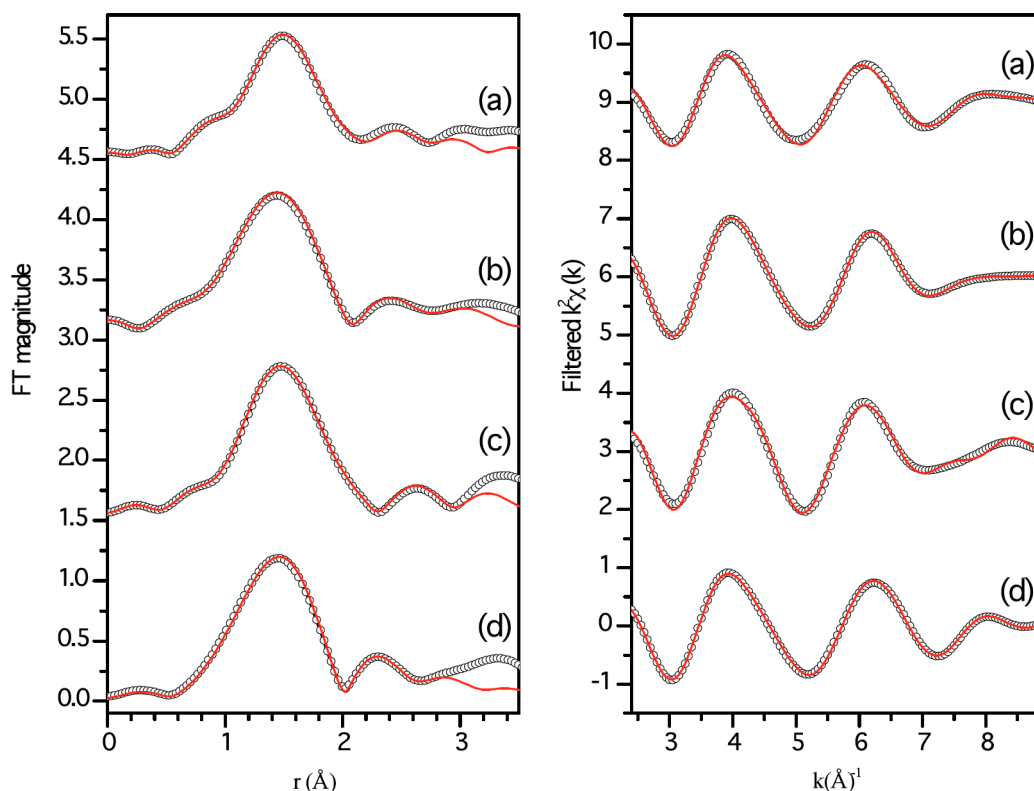


Figura 4.29. Transformadas de Fourier de la señal de EXAFS, no corregidas para el cambio de fases (izquierda) y filtradas (derecha). Se muestran las señales de EXAFS (línea de círculos negros) y los mejores ajustes (línea roja) para la muestra cristalina a pH 6.0 (a), y AmpD en solución a pH 5.6 (b), 7.0 (c) y 8.0 (d).

En la figura 4.29, se muestran las transformadas de Fourier de las señales de EXAFS y los ajustes obtenidos para las diversas muestras utilizadas. El ajuste de la curva (a), perteneciente a la muestra cristalina de la holoenzima a pH 6.0, permitió determinar la contribución de cuatro átomos en la primera esfera de coordinación. Estos átomos corresponden a dos nitrógenos (N1-N2), un oxígeno de un grupo carboxilo (O1) y otro oxígeno de una molécula de agua (O3). Fuera de esta primera esfera, los átomos alrededor (o por encima) de 2.5 Å presentes en la estructura, son un primer carbono 1 (C1) y un segundo oxígeno (O2) pertenecientes al mismo grupo carboxilo. Esto implica que el metal está siendo coordinado únicamente por un oxígeno del grupo carboxilo del Asp164. Lo que concuerda con lo observado en la estructura cristalográfica de la holoenzima (figura 4.5 A).

A pH 5.6 (proteína en solución), también se observan cuatro átomos en la primera esfera de coordinación (≈ 2 Å). Dos átomos de oxígeno (O1 y O2) correspondientes al grupo carboxilo, y dos átomos de nitrógenos (N1 y N2) de las dos histidinas adyacentes. El C1 también se encuentra fuera de la primera esfera de coordinación del metal (≈ 2.6 Å). Por tanto la principal diferencia con la AmpD cristalizada a pH 6.0, fue la ausencia de la molécula de agua (O3) en esta primera esfera de coordinación. También se observó una distorsión en la unión del grupo carboxilo, debido a la participación en este caso de sus dos oxígenos. La distancia entre el O2 y el átomo de Zn^{2+} se redujo considerablemente (tabla 4.5). Finalmente la estructura determinada por EXAFS a pH 5.6 concordó perfectamente con lo reportado para la estructura de RMN.

Tabla 4.5. Parámetros estructurales obtenidos de los ajustes del EXAFS para las muestras de AmpD*

Muestra		Grupo Carboxilo		H ₂ O/OH ⁻		Histidina 1	Histidina 2	¹ χ ²	² Factor R
Estado	pH	Zn-O1	Zn-O2	Zn-O3	Zn-O4	Zn-N1	Zn-N2		
Cristal	6	1.89	2.49	2.02	-	2.00	2.00	38.1	0.009
Líquido	5.6	2.00	1.99	-	-	2.04	2.08	17.0	0.002
Líquido	7.0	1.95	2.54	1.95	1.95	2.09	2.21	20.7	0.004
Líquido	8.2	1.94	2.45	1.94	1.94	2.07	2.24	15.3	0.003

*Distancias en Å

La desviación cuadrática media (σ²) para todos los valores fue 0.004 ± 0.001 Å²

Las distancias interatómicas (Å) compatibles con la coordinación al Zn, se muestran en negrita

¹Chi-cuadrático reducido

²Descrito como Σ[(data-fit)²]/[Σ(data)²]

Las muestras en solución a pH 7.0 y 8.2, también presentaron diferencias en la coordinación, en comparación con las determinadas a pH 6.0 y 5.6 (tabla 4.5). La estructura local del metal coordina cinco átomos, cuatro de ellos cercanos a 2 Å, y otro a 2.2 Å aproximadamente (N2). La primera esfera de coordinación está compuesta por los nitrógeno N1 y N2 (histidinas), un oxígeno (O1) del grupo carboxilo del ácido y otros dos oxígenos (O3 y O4) pertenecientes a una molécula de agua y un hidroxilo (OH^-). Estos resultados indican que el carboxilo del Asp164 se comporta en ambos casos, de forma similar a la observada para la muestra cristalina y la estructura de la holoenzima (ambas a pH 6.0). Esto es, coordinando el metal a través de sólo uno de sus oxígenos. Mientras, el incremento en la distancia de coordinación del N2, ha permitido la participación de una segunda molécula de agua/hidroxilo (O4). En la tabla 4.5 se resumen las distancias de coordinación determinadas por EXAFS para todas las muestras.

4.1.9. Efecto de las vesículas lipídicas en la actividad de AmpD

Para entender y estudiar las posibles causas que disparen la activación de AmpD, se realizaron ensayos de actividad en presencia de vesículas lipídicas que pudiesen mimetizar una posible interacción con la membrana. Los parámetros cinéticos son influenciados por la presencia de las vesículas lipídicas a una concentración de 1.5 mM. Ambos parámetros, K_m y K_{cat} se incrementan de forma significativa en presencia de las vesículas (tabla 4.6) preparadas a partir de extractos de lípidos de origen bacteriano.

Tabla 4.6. Efecto de las vesículas lipídicas en la actividad de AmpD

		K_m (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)
Tampón A				
	Sin lípidos	1.0 ± 0.1	10.5 ± 0.7	(10.8 ± 0.2) × 10 ³
	¹ Con lípidos	1.7 ± 0.1	16.5 ± 1.0	(10.0 ± 0.2) × 10 ³
Tampón B				
	Sin lípidos	1.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1	(5.1 ± 0.3) × 10 ³
	¹ Con lípidos	2.0 ± 0.3	11.9 ± 0.5	(6.0 ± 0.4) × 10 ³
*Tampón A: 20 mM de fosfato, 1.0 mM de DTT, pH 7.0				
*Tampón B: 40 mM de bicarbonato, 1.0 mM de DTT, pH 7.0				
¹ Concentración de 1.5 mg/ml				

4.2. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL DE GP61

4.2.1. Cristalización de Gp61

En la tabla 4.7, se resumen las condiciones iniciales en las cuales se obtuvieron resultados positivos (cristales pequeños), con el manejo del sistema de alto rendimiento de cristalización. Para ello se utilizó una la solución de Gp61 salvaje, a una concentración de 7 mg/ml. Los mejores resultados fueron alcanzados al escalar la condición 29 de la batería comercial *INDEX* (Hampton®), que contenía Tacsimoto™ al 60% (pH 7.0). Este precipitante es un reactivo de cristalización complejo, compuesto principalmente por ácidos de sales orgánicas (1.36 M de ácido malónico, 0.25 M de citrato de amonio tribásico, 0.12 M de ácido succínico, 0.3 M de ácido *DL*-málico, 0.4 M de acetato de sodio, 0.5 M de formiato de sodio y 0.16 M de tartrato de amonio tribásico) (McPherson, 2001). Las pruebas de difracción demostraron, que los cristales una vez escalados (figura 4.30), no difrataron los rayos X en el ánodo rotatorio y presentaron una pobre difracción (≈ 10 Å) en varias líneas del ESRF. Por esta razón se aplicó un proceso de optimización, variando sistemáticamente la concentración del precipitante (Tacsimoto™), el valor del pH del tampón, volumen y relación de gotas (proteína:precipitante) y además se añadieron algunos aditivos (detergentes). Con todo ello, se logró aumentar el tamaño de los cristales y se redujo la nucleación en la gota (figura 4.30). La condición final obtenida, consistió en Tacsimoto™ al 55% pH 6.5, detergente Tesit™ (dodecilpoli etilenglicoleter) a 200 mM y una relación de gotas de 1:2. Estos cristales de forma ovoidal (figura 4.30 B) difrataron hasta 2.8 Å.

Una vez optimizada la condición de cristalización con la proteína salvaje, se procedió a cristalizar el derivado de selenio-metionina (Gp61-SeMet). Se consiguieron buenos cristales tras unos ajustes mínimos en la concentración del precipitante (concentración final de 52%), y manteniendo los valores del resto de las variables.

4.2.2. Recogida y procesado de los datos de difracción de Gp61 y Gp61-SeMet

Los cristales de Gp61 y Gp61-SeMet no necesitaron de la adición de una solución crioprotectora, dado que el Tacsimoto™ funciona como tal a partir del 40%. Se colectó un conjunto de datos de MAD con los cristales de Gp61-SeMet en la línea ID14-4 del ESRF (figura 4.31). El procesado de los datos de MAD de Gp61-SeMet presentó unas excelentes estadísticas que se resumen en la tabla 4.8.

Tabla 4.7. Condiciones de cristalización de Gp61 salvaje¹ con resultados positivos en el barrido inicial de alto rendimiento

Condición	Precipitante	Tampón ²	Aditivo	Resultado
Nº 30 de JCSG	40% PEG 300 (m/v)	Fosfato-citrato pH 4.2	-	Cristales esféricos
Nº 44 de CS I y II	20% etanol (v/v)	Tris pH 8.5	-	Barras macladas
Nº 4 de CS I y II	2M de sulfato amónico	Tris pH 8.5	-	Barras macladas
Nº 45 de JCSG	25% PEG 4000 (m/v)	-	0.17 M sulfato de amonio 15% glicerol (v/v)	Cristales amorfos
Nº 29 de INDEX	Tacsimato™	1.36 M de ácido malónico 0.25 M de citrato de amonio tribásico 0.12 M de ácido succínico 0.3 M de ácido <i>DL</i> -málico 0.4 M de acetato de sodio 0.5 M de formiato de sodio 0.16 M de tartrato de amonio tribásico pH 7.0	-	Cristales de forma ovoidal

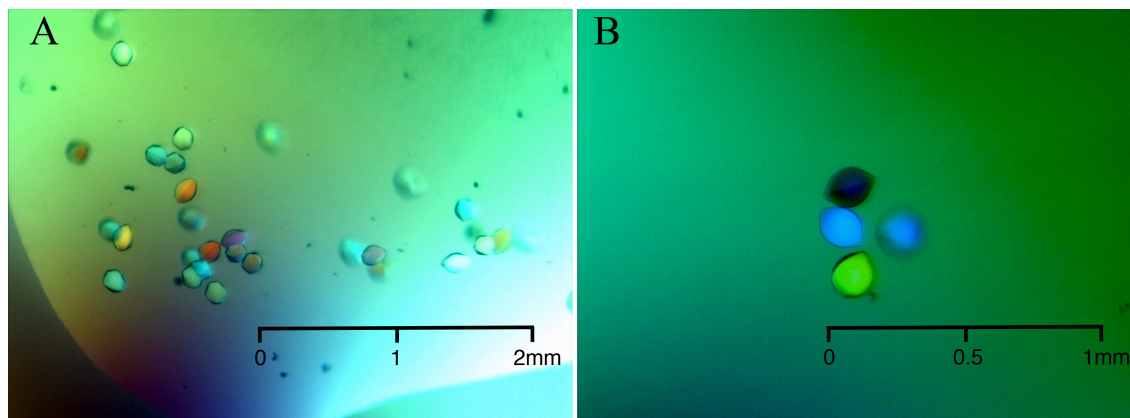
¹Proteína pura a 7 mg/mL en 10 mM de Tris, 20 mM de NaCl₂²La concentración de los tampones fue 100 mM, a menos que se indique lo contrario

Figura 4.30. Cristales de Gp61. (A) Cristales iniciales de Gp61 obtenidos en la condición comercial número 29 de INDEX, compuesta por Tacsimato™ a pH 7.0. (B) Cristales escalados y mejorados, a partir de la variación del pH, la concentración del Tacsimato™ y la adición del detergente Tesit™. Estos últimos cristales, mejoraron enormemente su capacidad de difracción de los rayos X, respecto de los cristales escalados sin la adición del detergente.

Condición de cristalización de Gp61

Tampón: Tacsimato™ pH 5.5

1.36 M de ácido malónico
0.25 M de citrato de amonio tribásico
0.12 M de ácido succínico
0.3 M de ácido *DL*-málico
0.4 M de acetato de sodio
0.5 M de formiato de sodio
0.16 M de tartrato de amonio tribásico

Precipitante: Tacsimato™ 55%

Aditivo (detergente): Tesit™ 200 mM

Volumen de la gota: 3 µl

Relación de gotas (proteínas/precipitante): 1:2

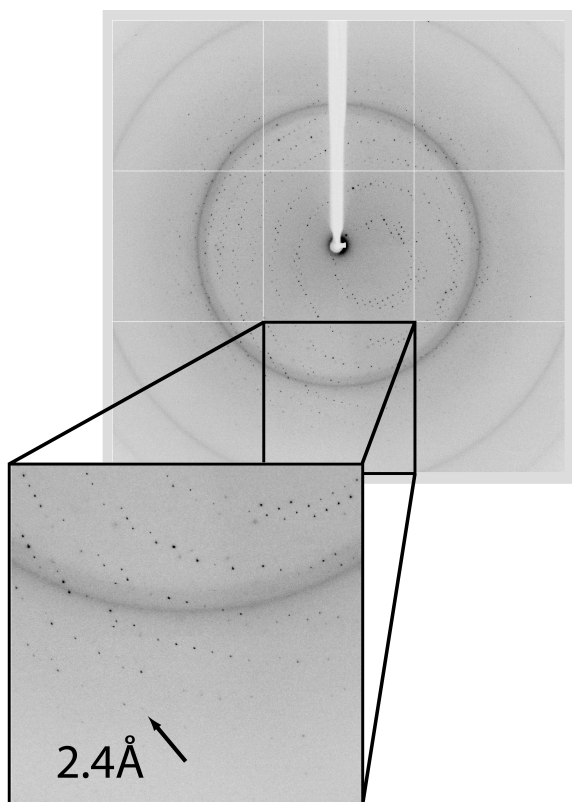


Figura 4.31. Imagen del patrón de difracción de los cristales de Gp61-SeMet. Esta imagen pertenece al conjunto de datos colectado en el correspondiente pico energético de absorción del átomo de selenio ($\lambda = 0.97950 \text{ \AA}$). En el acercamiento (recuadro inferior izquierdo) se observan reflexiones hasta 2.4 \AA .

La resolución del conjunto de datos con mejores estadísticas globales (el pico, $\lambda = 0.97950 \text{ \AA}$) alcanzó los 2.4 \AA (tabla 4.8). El indexado de los datos permitió determinar los parámetros de la celdilla unidad, $a = b = 116.75 \text{ \AA}$, $c = 86.84 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120.0^\circ$. El cristal mostró una simetría perteneciente al Grupo Espacial hexagonal primitivo $P3_121$. Tomando en cuenta el peso molecular de Gp61 (23 kDa, con 208 residuos), se estimó la probable presencia de dos o tres moléculas en la unidad asimétrica, con un contenido de solvente de 66% y 48% respectivamente. Esta determinación se llevó a cabo mediante el cálculo del coeficiente de Matthews ($3.46 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$) (Matthews, 1968). Sin embargo, la resolución alcanzada por los cristales (siempre por debajo de 2.4 \AA), indicó que la primera opción (dos moléculas) sería la más probable.

4.2.3. “Faseado” *de novo* por el método de MAD

Una vez procesados (indexados, integrados y escalados) y preparados (cambio de formato), los datos de las tres longitudes de onda que componían el conjunto de datos MAD, se determinaron todas las posiciones de los ocho átomos de selenio en la unidad asimétrica. La mejor solución obtenida por *SHELXD* (Schneider & Sheldrick, 2002; Sheldrick, 2002) presentó una correlación del 46.32%. Las posiciones fueron refinadas, y se discriminó el enantiómero correcto de forma fiable con el programa *SHELXE*. Los mapas obtenidos, con un coeficiente de correlación de $|E^2| = 0.632$, presentaron una buena conectividad. El contenido de solvente fue optimizado al 58.4%. No obstante, los mapas calculados por *SHELXE*, presentaron poca definición en algunas regiones, y por esta razón se utilizó un programa computacionalmente más potente, *SHARP* (de La Fortelle & Bricogne, 1997), que integra el programa *SOLOMON* para la mejora de las fases.

Tabla 4.8. Resumen del procesado de los datos cristalográficos de los cristales derivados de SeMet de Gp61.

Parámetros	Gp61-SeMet		
Sistema cristalino	Hexagonal primitivo		
Grupo Espacial	$P3_121$		
Celdilla Unidad			
a, b, c (Å)	116.75, 116.75, 86.84		
α, β, γ (°)	90, 90, 120		
Moléculas en la UA	2		
Solvente (%)	58.4%		
Fuente de Radiación	X, Sincrotrónica		
Coefficiente de Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	3.46		
Temperatura (K)	100		
	Pico	Punto de inflexión	Remoto
Longitud de Onda (Å)	0.97950	0.97955	0.97550
Resolución (Å)	2.4	2.4	2.6
Reflexiones únicas	31863	31982	29385
Complejidad (%)	99.2 (100)	99.1 (100)	98.7 (100)
Multiplicidad	7.9 (5.4)	5.6 (4.1)	5.8 (5.7)
* R_{merge} (%)	10.0 (50.0)	12.0 (79.0)	16.0 (78.0)
R_{anom} (%)	4.7 (27.2)	6.1 (38.9)	5.8 (39.7)
$I/\sigma(I)$	15.9 (3.0)	12.7 (3.2)	9.4 (3.0)

Los valores entre paréntesis corresponden a la concha de mayor resolución.

* $R_{\text{sym}} = \sum |I - I_{\text{av}}| / \sum I$ para todo el rango de resolución.

Las coordenadas obtenidas de los átomos de selenio, con el programa *SHELXD*, fueron introducidas en *SHARP*. Se determinaron fases nuevamente y se calcularon los mapas de forma automatizada, obteniendo los mejores con sólo dos longitudes de onda (pico y punto de inflexión, máximos de f'' y f' respectivamente). Los mapas finales, posteriores al aplanado de solvente, calculados con el programa *SOLOMON* (Abrahams & Leslie, 1996), hasta una resolución de 2.4 Å, fueron utilizados para la construcción automática del modelo.

4.2.4. Construcción del modelo de Gp61 y refinamiento de la estructura

A partir de los mapas de densidad electrónica, se trazó el modelo inicial que fue construido con el programa *BUCANEER* (CCP4). Éste cubrió menos del 50% del total de los residuos de la unidad asimétrica y presentó una gran fragmentación. Además se asignaron pocas cadenas laterales, únicamente un 15% de los residuos ubicados automáticamente (el resto fue asignado como alaninas). Por esta razón, casi todo el modelo fue trazado manualmente utilizando el programa *O* (Jones *et al.*, 1991), hasta completar uno de los monómeros de la unidad asimétrica. Posteriormente se ubicó este modelo en la posición del segundo monómero, completando la unidad asimétrica, y se realizaron los ajustes de las pequeñas diferencias existentes entre los monómeros.

Finalmente se construyeron 198 residuos (desde el aminoácido 8 hasta el 206) para la molécula A y 214 (desde el aminoácido 7 hasta el 221) en la molécula B. En esta última molécula, se incluye una buena parte de la extensión peptídica codificada por el vector que fue utilizado en el clonaje (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007). El proceso de construcción se llevó a cabo refinando el modelo en *CNS* de forma iterativa, hasta

obtener el mejor modelo posible, de esta forma y a medida que mejoró el modelo, también mejoraron las fases y por ende los mapas.

Tabla 4.9. Estadísticas del refinamiento de Gp61-SeMet	
Parámetros	Gp61-SeMet
“Faseado”	
Figuras de mérito*	0.56
² R _{cullis}	
Céntricas	0.0/0.065
Acéntricas	0.0/0.258
Selenios	8
Refinamiento	
Resolución (Å)	48.4-2.40
R _{work} /R _{free}	0.195/0.235
Nº de átomos	
Proteína	3182
Agua	129
Selenios	8
Total	3311
Factores B (Å ²)	
Proteína	59.17
Agua	44.51
Desviación de los valores ideales	
Enlaces (Å)	0.005
Ángulos (°)	1.055
Residuos en la unidad asimétrica	412
Ramachandran**	97.4/2.6
* Estadísticas calculadas para los datos combinados por CAD	
** Favorables/No favorables	
¹ Reflexiones únicas	
² ISO/ANO	

Debido a la baja resolución alcanzada por los datos nativos (hasta 2.8 Å), el modelo más completo fue refinado con los mejores datos de difracción obtenidos; los correspondientes al pico de los datos de MAD. Posteriormente se añadieron las moléculas de agua en varios ciclos de refinamiento. Las estadísticas finales del refinamiento se resumen en la tabla 4.9. La estereoquímica del modelo, verificada con el programa *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993), presentó un 97.4% de los residuos en las regiones más favorables del diagrama de Ramachandran y otro 2.6% en las zonas permitidas (figura 4.32).

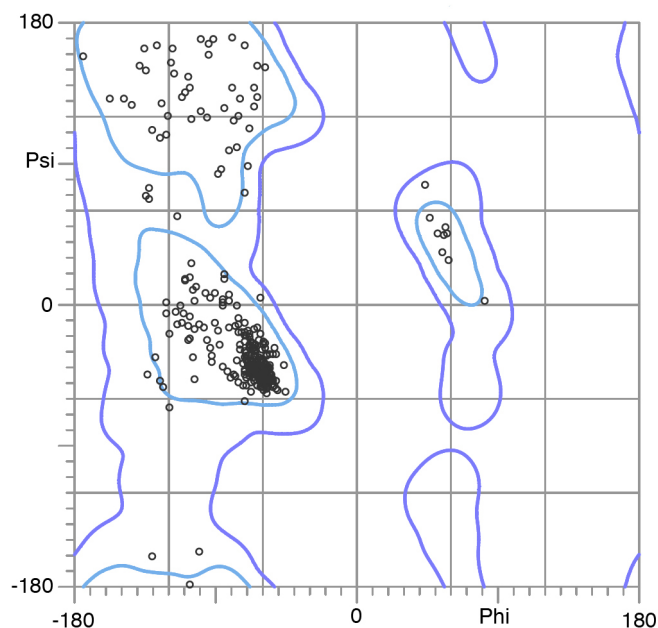


Figura 4.32. Diagrama de Ramachandran del modelo refinado de Gp61.

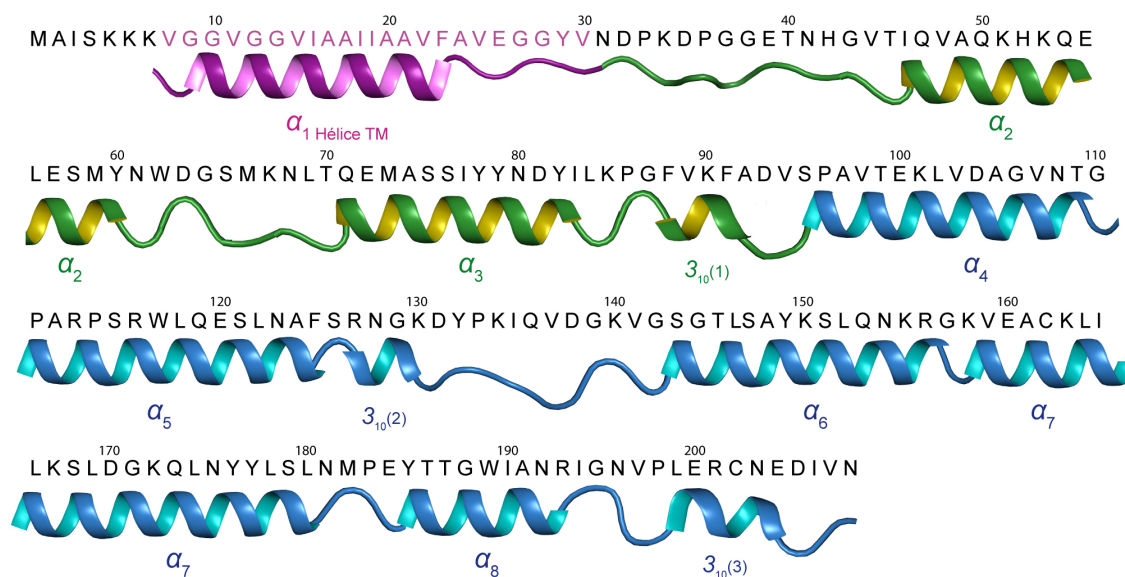


Figura 4.33. Distribución de la estructura secundaria de Gp61. Los colores representan la separación estructural de los dominios que fueron identificados por comparación de secuencia. Dominio transmembrana (magenta) y el dominio de unión a peptidoglicano (azul). En verde se representa la región que no posee una homología evidente con el resto de las glicosil hidrolasas.

4.2.4. Descripción estructural de Gp61. Organización y plegamiento general

La estructura tridimensional de Gp61 en su conformación soluble, consiste en 8 hélices α y 3 hélices del tipo 3_{10} , distribuidas de la siguiente forma: α_1 9-24; α_2 46-60; α_3 71-83; $3_{10}(1)$ 88-92; α_4 96-109; α_5 111-125; $3_{10}(2)$ 127-130; α_6 143-156; α_7 158-180; α_8 185-193; $3_{10}(3)$ 199-204 (figura 4.33 y 4.34).

El servidor *STRIDE* (<http://webclu.bio.wzw.tum.de>) no identificó ninguna lámina β en la estructura. El motivo EGGY, conservado en la nueva familia de murein

hidrolasas GH108, pfam05838 (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007), contiene el glutámico catalítico 26 (E26). Esta secuencia se encuentra estructuralmente ubicada en un gran lazo (24-45) entre las hélices α_1 y α_2 , el lazo L_1 . Además, en este lazo también se encuentran los residuos que completan la tríada catalítica. Este hecho convierte funcionalmente al L_1 , en parte estructural de la región catalítica. L_1 , con unos factores de agitación significativamente por encima de la media de la proteína (figura 4.35), posee una alta similitud estructural con lazos funcionalmente equivalentes en varias lisozimas cuyas estructuras han sido previamente determinadas, como la lisozima del fago T4, Lyz^{P1} (lisozima del fago P1) y R^{21} (lisozima del colifago 21) (Weaver *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009).

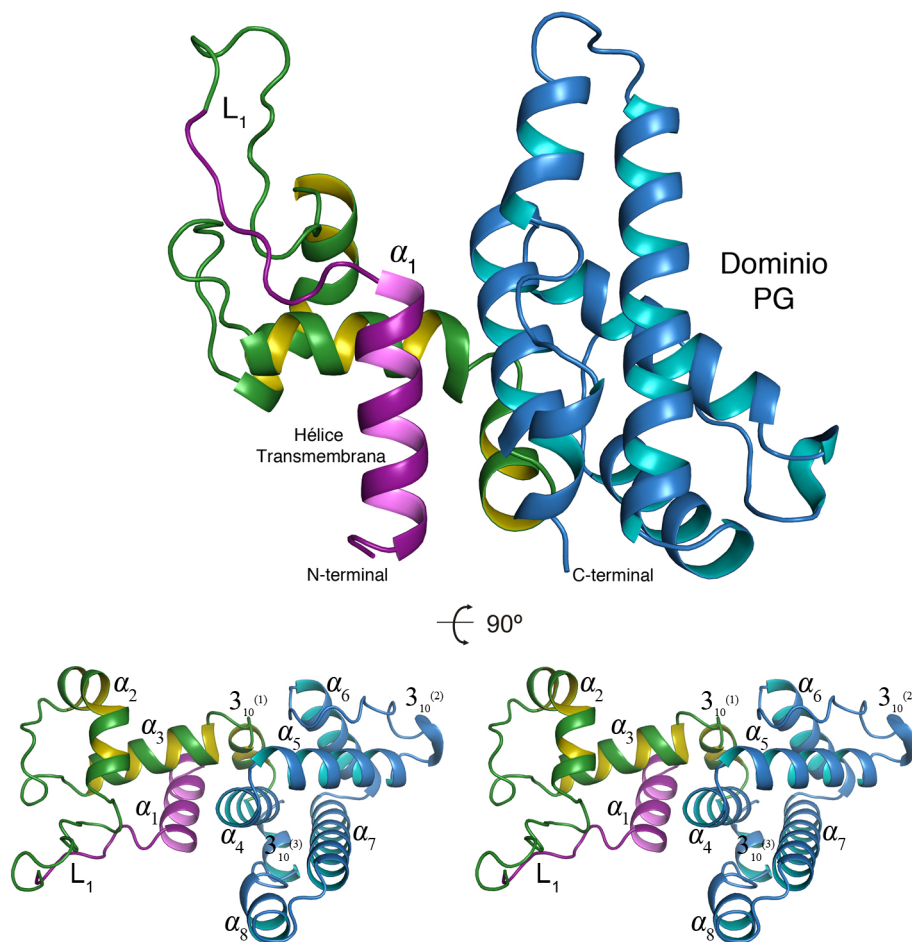


Figura 4.34. Estructura general de Gp61. Arriba se observa la representación esquemática de la estructura de Gp61. El dominio transmembrana se representa en color magenta y comprende la hélice α_1 (hélice transmembrana), y parte del lazo L_1 . El dominio de unión a peptidoglicano se presenta en color azul. En color verde se distingue parte del lazo L_1 (residuos 32-45) y el lóbulo que comprende la región menos conservada en la nueva familia GH108 (región altamente variable, residuos 46-94). En la parte inferior (giro de 90°) se presenta una imagen estereoscópica con la distribución de la estructura secundaria indicada.

La hélice transmembrana, α_1 (hélice TM), se encuentra flanqueada por el lazo L_1 y siete residuos del extremo N-terminal. Se extiende desde la Gly9 hasta la Phe23, formando parte del dominio de inserción a membrana, conjuntamente con una porción importante del lazo L_1 (residuos 24-31). Esta hélice anfipática, se empaqueta interactuando de forma directa con las hélices α_3 , $3_{10}(1)$ y α_4 (figura 4.34). La hélice TM comprende 14 residuos, con una longitud total de 20.2 Å de largo (figura 4.39).

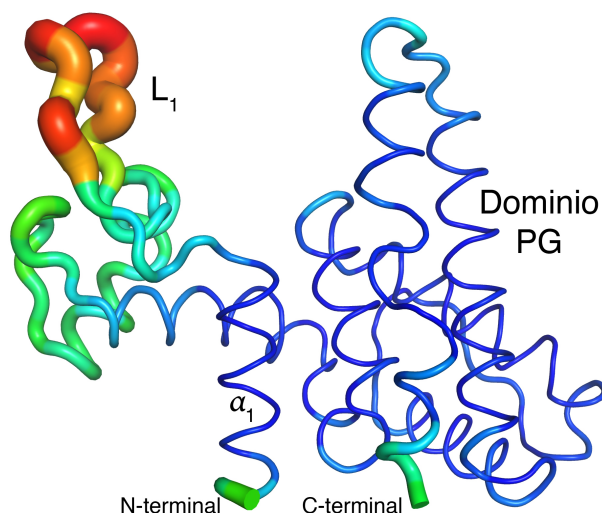


Figura 4.35. Representación de los factores atómicos de agitación térmica (factores B). Se representa por colores y grosor de la cadena. La degradación de color entre el azul (valores mínimos) y el rojo (máximo valor) expresa de forma relativa los valores de agitación térmica. El grosor de la cadena está relacionado de forma directamente proporcional a los factores B. A mayor grosor, mayor el valor de agitación térmica. Claramente la región con mayor agitación térmica se corresponde con el lazo L_1 . El dominio PG y la hélice transmembrana (α_1) presentan los menores valores de agitación térmica.

La zona más conservada del dominio de unión a peptidoglicano (dominio PG), se extiende desde la Arg116 hasta la Gly156, aunque estructuralmente el dominio es mucho mayor, y comprende desde el residuo 95 hasta el 208 (figura 4.36). Este dominio ha sido definido por homología con secuencias de la familia de dominios pfam09374 (Pei & Grishin, 2005), superfamilia PG_binding_3. Según el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sólo una estructura de esta familia de dominios, un activador putativo secretado por *Porphyromonas gingivalis* (código PDB 2NR7), ha sido estructuralmente resuelta (figura 4.37). Aunque Lyz^{NM} (código PDB 2IKB) también parece pertenecer a ella, según la predicción de dominios realizada en el mismo servidor.

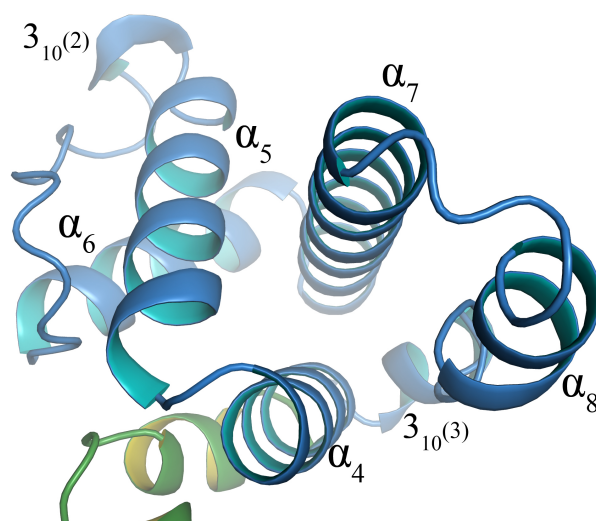


Figura 4.36. Estructura del dominio de unión a peptidoglicano. El dominio de unión a PG (en azul) comprende las hélices α_4 , α_5 , α_6 , α_7 y α_8 ; y las hélices $3_{10}(2)$ y $3_{10}(3)$. La región central compuesta por las hélices α_4 , α_5 , α_6 y α_7 , presentan un plegamiento típico de las enzimas de unión a peptidoglicano de bajo peso molecular (20-30 kDa).

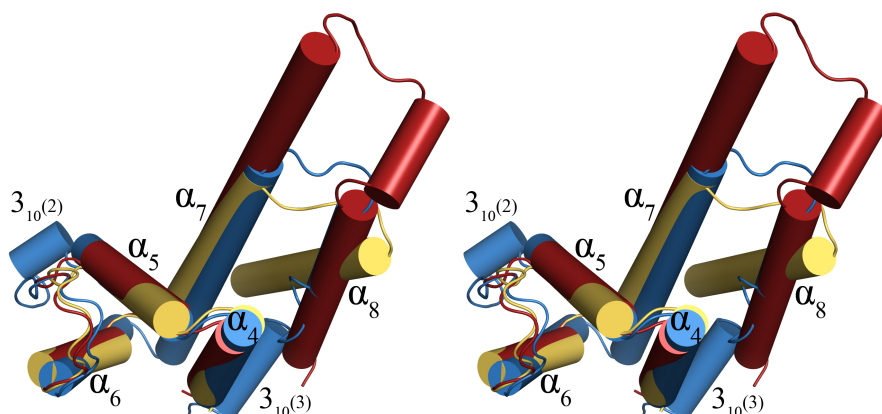


Figura 4.37. Imagen estereoscópica de la superposición del dominio de unión a peptidoglicano de Gp61 con el de enzimas pertenecientes a la familia pfam09374 (parte de la superfamilia PG_binding_3, código NCBI cl09627). En azul se muestra el dominio PG de Gp61, la identificación de la estructura secundaria se basa en la estructura de Gp61. La estructura de la enzima putativa de *N. meningitidis*, Lyz^{Nm} , (código PDB 2IKB), en amarillo, muestra una similitud muy alta en la distribución de la estructura secundaria, aunque no posee las hélices $3_{10}(2)$ y $3_{10}(3)$. En general la estructura secundaria coincide en posición y tamaño de las hélices entre ambas proteínas. Por su parte el activador putativo de *P. gingivalis* W3 (rojo), código PDB 2NR7, coincide de forma muy precisa en todas las hélices α , aunque varía de forma significativa en el tamaño de la α_7 e incluye otra hélice entre las hélices α_7 y α_8 .

La comparación estructural utilizando el servidor *DALI* (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/) (Holm & Rosenstrom, 2010), arrojó como resultado la presencia de varias estructuras, con homologías variables. La más similar a Gp61, fue la estructura de una proteína hipotética de *Neisseria meningitidis* (NMB1012 o Lyz^{Nm}). Lyz^{Nm} con una identidad del 30% (código PDB 2IKB), presentó un valor Z de 12.6, con un RMSD de 4.0 Å para 151 residuos y un RMSD de 1.3 Å para el dominio de unión a PG (figura 4.37). Esta enzima putativa de *N. meningitidis* es la única clasificada dentro de la familia GH108, cuya estructura ha sido resuelta. En segundo lugar con un valor Z de 8.1 (RMSD de 2.0 Å para 95 residuos), una proteína clasificada como un activador putativo secretado por *Porphyromonas gingivalis* (código PDB, 2NR7). Posteriormente aparecen otras enzimas que hidrolizan distintas cadenas de polisacáridos como la quitonasa, varias lisozimas incluyendo la del fago T4, y la transglucosilasa lítica de *E. coli* Slt70. Según este resultado existe una similitud estructural entre proteínas con distancias filogenéticas considerablemente altas.

En contraste a la alta conservación del dominio de unión a peptidoglicano, encontramos una región con una alta variabilidad (figuras 4.34 y 4.38), tanto dentro de la familia GH108, como en comparación con otras enzimas estructural y funcionalmente relacionadas. Esta región (en verde en la figura 4.34 y 4.38 A) se extiende entre el lazo catalítico (L_1) y el inicio del dominio PG. En el caso de Gp61 comprende los residuos 46-94, abarcando las hélices α_1 , α_2 y la $3_{10}(1)$. En otras enzimas su tamaño y distribución de la estructura secundaria varía de forma significativa (figura 4.38). Sin embargo, a pesar de su bajo nivel de conservación, esta región parece estar implicada en la conformación de parte del sitio de unión a sustrato (probablemente de unión a los azúcares en el caso de Gp61), y además establece interacciones importantes con el lazo catalítico en la mayoría de las enzimas resueltas. Algunas de esas interacciones, como se verá en capítulos posteriores, involucran residuos altamente

conservados, incluyendo el glutámico y la tirosina que forman parte de la secuencia EGGY.

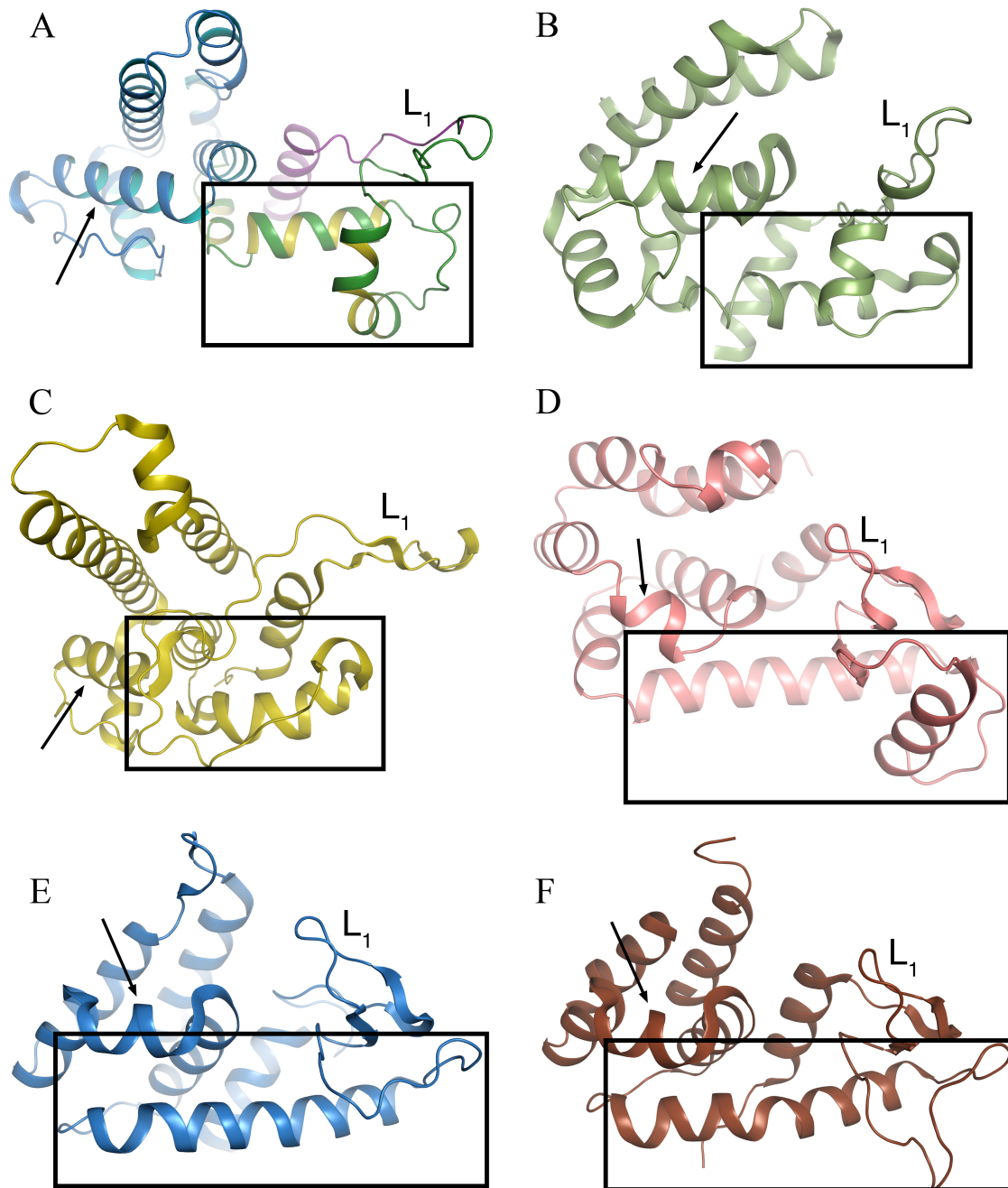


Figura 4.38. Conformación de la región variable en las lisozimas relacionadas estructural y filogenéticamente con Gp61. (A) En Gp61, la región variable se resalta por el recuadro y el color verde en la estructura, manteniendo de esta forma el patrón de colores las anteriores figuras. En el resto de las estructuras la región variable se resalta por el recuadro; esta región siempre se ubica entre el lazo catalítico (L_1) y el inicio del dominio de unión a PG. (B) Proteína putativa de *N. meningitidis*, Lyz^{Nm} , (código PDB 2IKB); (C) activador secretado por *P. gingivalis* (código PDB 2NR7); (D) lisozima del fago T4 (código PDB 2LZM); (E) R^{21} , lisina del colifago P21 (código PDB 3HDE) y (F) lisozima del colifago P22 (código PDB 2ANX). Los lazos que contienen la tríada catalítica de cada enzima han sido etiquetados (L_1). Las flechas indican la posición de la hélice α_5 en Gp61 (A), conservada en el dominio de unión a PEG, y sus homólogos estructurales en el resto de las proteínas.

4.2.5. Análisis estructural del mecanismo de translocación

El dominio transmembrana (DTM) comprende la hélice α_1 , y parte del lazo catalítico (L_1). La hélice α_1 , con una longitud de 20.2 Å comprende los residuos del 10 al 23 y presenta una característica anfipática moderada sin presencia de residuos polares (Nyholm *et al.*, 2007), y una orientación clara en la conformación soluble. Los residuos hidrofóbicos más voluminosos que la componen (Val11, Val14, Ile15, Ile18, Ile19, Val22 y Phe23) interactúan con el núcleo de la proteína; mientras que los residuos pequeños (Gly10, Gly12, Gly13, Ala16, Ala17, Ala20 y Ala21) son expuestos al solvente (figura 4.39).

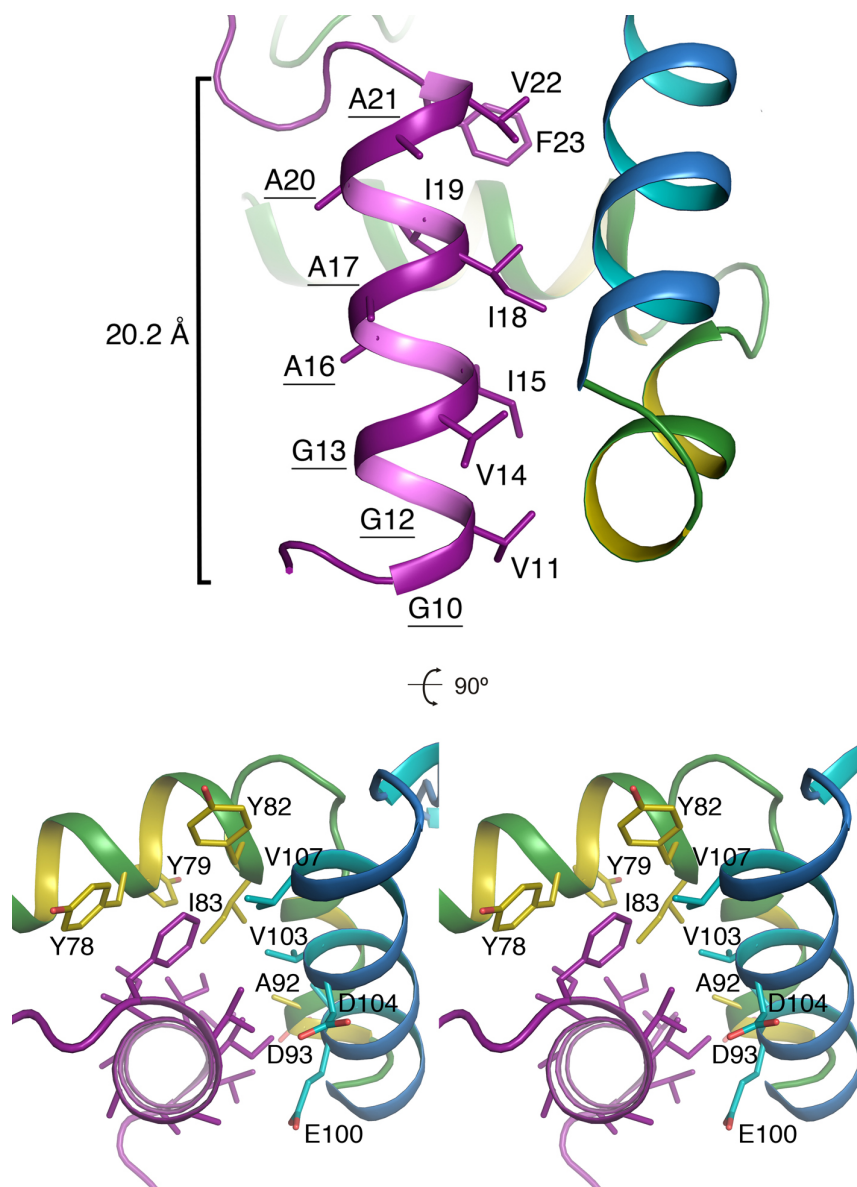


Figura 4.39. Detalle de la estructura de la hélice transmembrana (hélice TM) de Gp61 en su conformación soluble. Arriba se observa la distribución de los residuos en la hélice transmembrana; los residuos cuyas etiquetas han sido subrayadas son los que se exponen al solvente (todos ellos alaninas y glicinas). Abajo se muestra una imagen estereoscópica (con un giro de 90°) de la interacción de hélice TM con el núcleo de la enzima, específicamente con residuos de las hélices α_3 , α_4 y $3_{10}(1)$. Claramente los residuos hidrofóbicos más voluminosos (isoleucina, valina y fenilalanina) se orientan hacia el interior, rehuyendo al solvente.

La Phe23, parece mantener las interacciones más fuertes con el núcleo de la enzima, empaquetándose entre los residuos Tyr78 y Tyr82 de la α_3 (región variable) y la Val107 de la α_4 (dominio de unión a PG). Otros residuos involucrados en la estabilización de la conformación soluble del dominio transmembrana son Tyr79, Ile83, Val103 y Ala92. Todos ellos forman una superficie de interacción para los residuos de la hélice TM. Por su parte, los residuos Asp94, Asp93 y Glu100, aunque no establecen interacciones polares, también son parte de la superficie de interacción a través de sus largas cadenas laterales (figura 4.39 abajo).

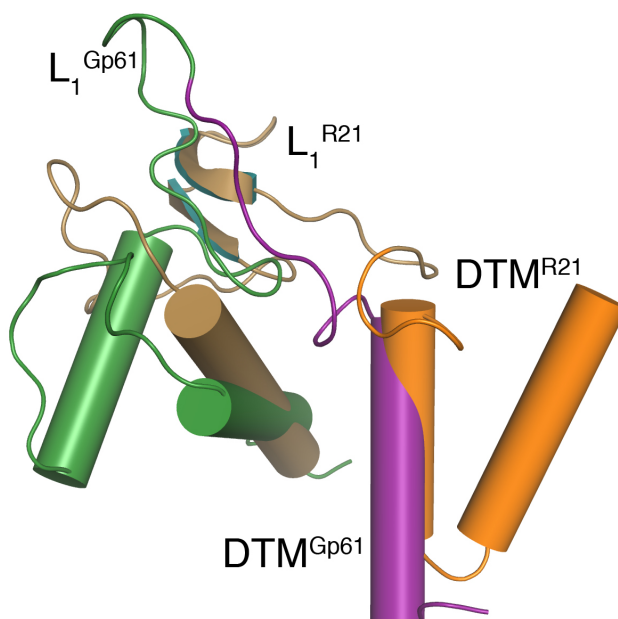


Figura 4.40. Superposición de las regiones implicadas en la translocación de Gp61 y de R²¹. El dominio transmembrana de Gp61 (magenta) comprende una única hélice transmembrana, mientras que el dominio SAR de R²¹ (naranja), incluye un par de hélices (ambas con características netamente hidrofóbicas) que podrían formar una hélice de mayor tamaño que se inserta atravesando la membrana plasmática (Sun *et al.*, 2009).

La comparación estructural con la lisozima R²¹ (Sun *et al.*, 2009), muestra una diferencia importante en el tamaño del dominio transmembrana de ambas. En R²¹, el dominio incluye una segunda hélice con características netamente hidrofóbicas y de similar tamaño a la única hélice TM de Gp61 (figura 4.40). El tamaño de estas dos hélices puede alcanzar en R²¹, fácilmente los 30 Å de longitud al desplegarlas en línea recta, componiendo una única hélice de hasta 23 residuos (Sun *et al.*, 2009).

En Gp61, la secuencia ²⁴AVEGGYV³¹ que forma parte del lazo catalítico, parece interactuar de forma directa con la membrana, ocluyendo el ácido catalítico E26, y funcionando como un sistema de regulación (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007).

4.2.6. Hidrólisis del peptidoglicano, mecanismo catalítico

El motivo EGGY, conservado en la familia GH108, define la posición del glutámico catalítico en Gp61. El resto de residuos catalíticos, no han sido bioquímicamente corroborados en GP61 y tampoco para la familia GH108. La dilucidación del glutámico donador de protones (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007), permitió la búsqueda del resto de los residuos catalíticos en su secuencia.

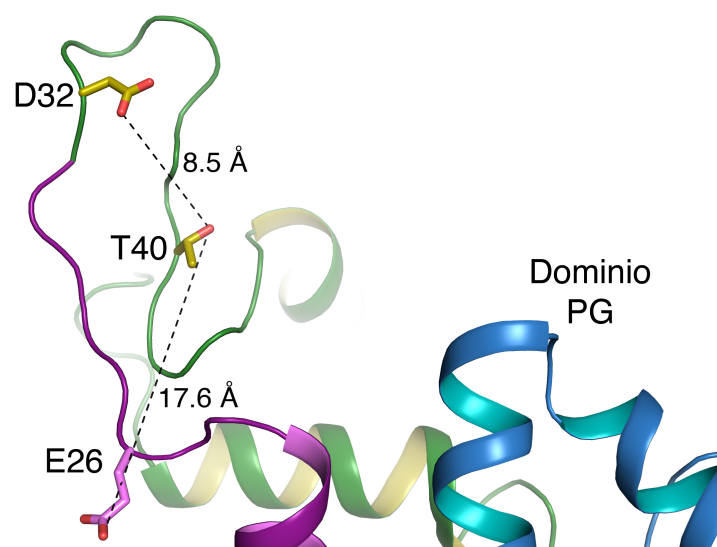


Figura 4.41. Posición de la tríada catalítica putativa en Gp61. Las distancias se indican con las líneas discontinuas en negro. Las distancias Glu26-Thr40-Asp32 están por encima de las canónicas en las lisozimas de bacterias y bacteriófagos. Sin embargo, estas largas distancias parecen conservarse en lisozimas más cercanas estructural y filogenéticamente.

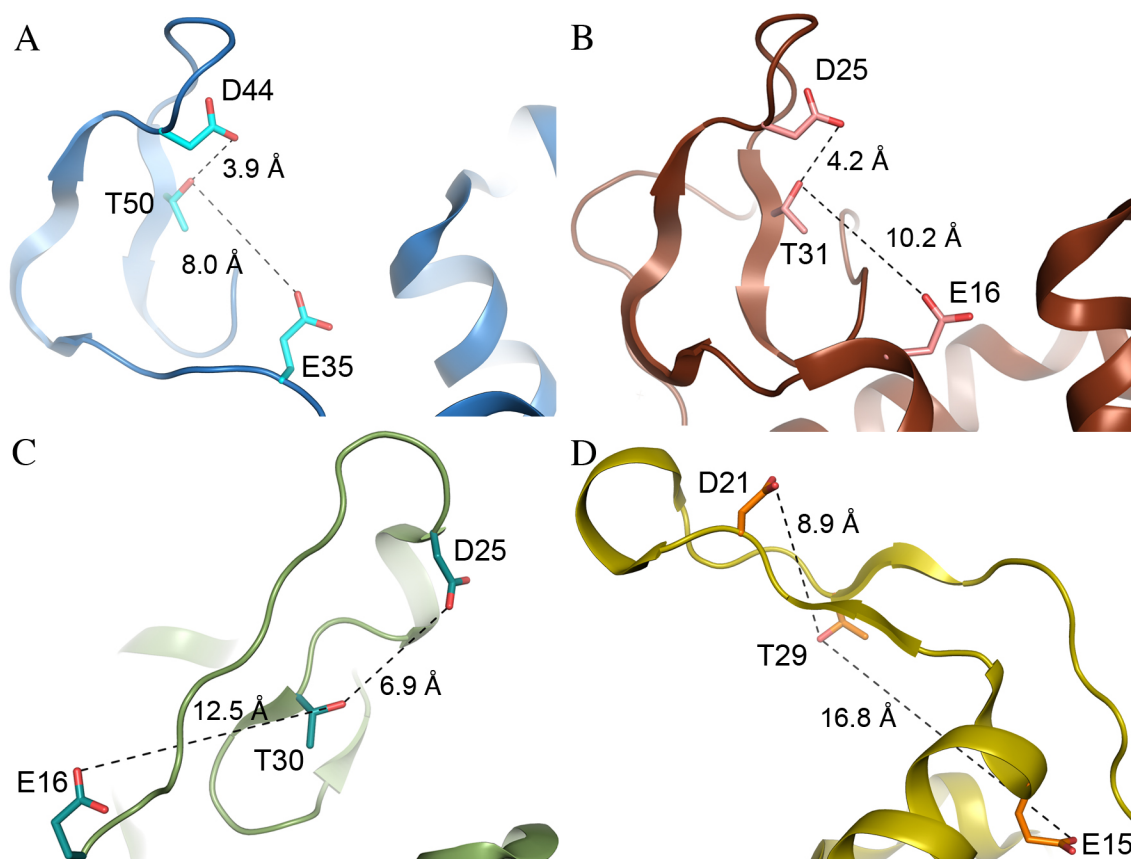


Figura 4.42. Comparación de las tríadas catalíticas de distintas lisozimas relacionadas estructural y filogenéticamente con Gp61. (A) Lisozima R²¹; (B) lisozima del fago P22; (C) lisozima putativa de *N. meningitidis* (código PDB 2IKB) que forma parte de la familia GH108; (D) activador secretado por *P. gingivalis* (código PDB 2NR7). Los residuos catalíticos determinados experimentalmente (A y B) y los residuos catalíticos putativos asignados por comparación estructural o de secuencia (C y D) han sido etiquetados.

La búsqueda se basó en la comparación con la tríada canónica de lisozimas (como la de T4) y otras glicosilasas de bacteriófagos, cuyo motivo ha sido definido como Glu-8aa-Asp/Cys-5aa-Thr (Sun *et al.*, 2009). La comparación estructural con enzimas cuyas tríadas catalíticas han sido determinadas experimentalmente (Figura 4.42 A y B), también ayudó para finalmente proponer los residuos Asp32 y Thr40 como parte de la tríada en Gp61 (figura 4.41).

Las distancias entre los residuos de la posible tríada catalítica de Gp61, son superiores a la mayoría de las lisozimas de bacteriófagos, especialmente las que poseen dominios SAR (Xu *et al.*, 2004; Mooers *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009). Sin embargo, en las enzimas con mayor homología de secuencia (y estructural) con Gp61, las distancias entre los residuos de las tríadas catalíticas putativas son muy similares (figura 4.42 C y D). Otra propiedad sorprendente en el modelo cristalográfico de Gp61, es la disposición que exhibe el ácido catalítico E26, cuyo grupo carboxilo apunta en dirección opuesta al L_1 (figuras 4.41 y 4.43). En esta conformación, el E26 mantiene un enlace de hidrógeno relativamente débil (3.5 Å) con la Gln71, la cual se ubica al inicio de la α_3 en la región variable (figura 4.44). La comparación de L_1 con el lazo catalítico de la lisozima putativa de *N. meningitidis* (L_1^{2IKB}), cuyas secuencias son virtualmente idénticas a lo largo del lazo, muestra una diferencia posicional importante. La colocación de L_1^{2IKB} es apreciablemente más cerrada contra el núcleo de la enzima y, además, la cadena lateral de su glutámico catalítico (E16) se dirige hacia el propio lazo (figura 4.43).

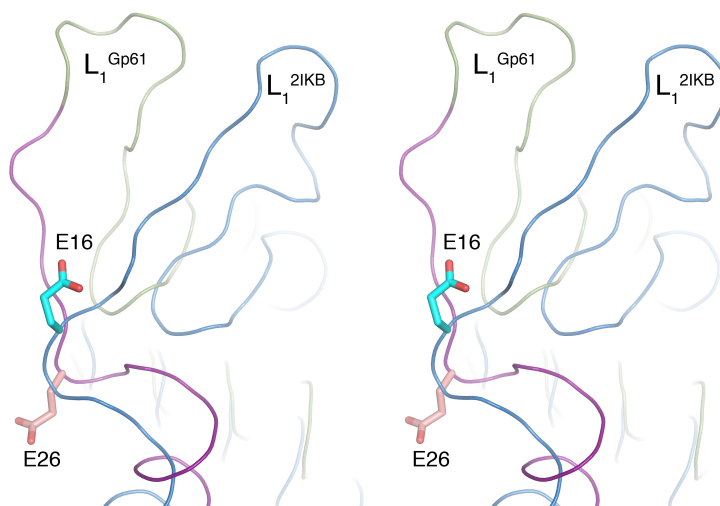


Figura 4.43. Imagen estereoscópica de los lazos catalíticos de las estructuras de Gp61 (magenta-verde) y la lisozima putativa de *N. meningitidis* (azul) superpuestas. Se observa una diferencia clara en la disposición relativa de ambos lazos. El lazo de Gp61 muestra una mayor abertura y su ácido catalítico (E26, barras rosas) se dispone contrariamente a la posición del lazo. Por su parte, en la estructura de *N. meningitidis* (2IKB), el lazo se encuentra más cerrado respecto del núcleo de la proteína, y su ácido catalítico (E16, barras azules) se dispone en dirección al lazo.

La región “bisagra” entre las posiciones de ambos lazos, parece encontrarse en la secuencia $^{26}\text{EGGY}^{29}$. Específicamente en las glicinas de esta secuencia altamente conservada en la familia GH108. De hecho, como se mencionó anteriormente, L_1 presenta unos factores de agitación muy altos, al igual que parte de la región variable (figura 4.44). Por otra parte, la Pro33 y su homóloga correspondiente en esta enzima putativa (Pro23) poseen configuraciones distintas de sus grupos aminos, *cis* y *trans* respectivamente.

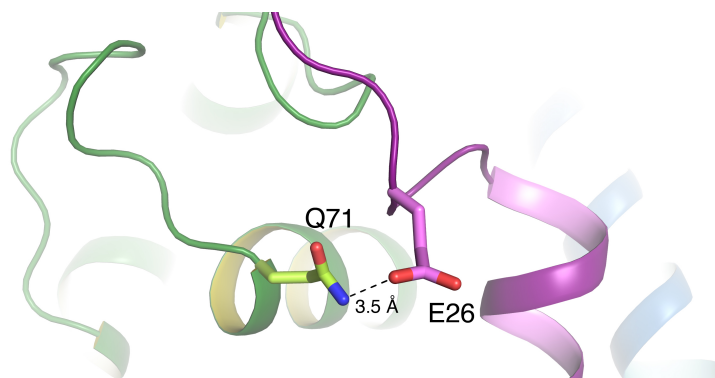


Figura 4.44. Posición del glutámico catalítico de Gp61, E26 (barras rosas), interactuando con la glutamina 71 (barras verdes), de la región variable. La estructura general de Gp61 mantiene el código de colores del resto de las figuras. Ambos residuos están etiquetados en la imagen. La interacción se resalta en forma de línea discontinua.

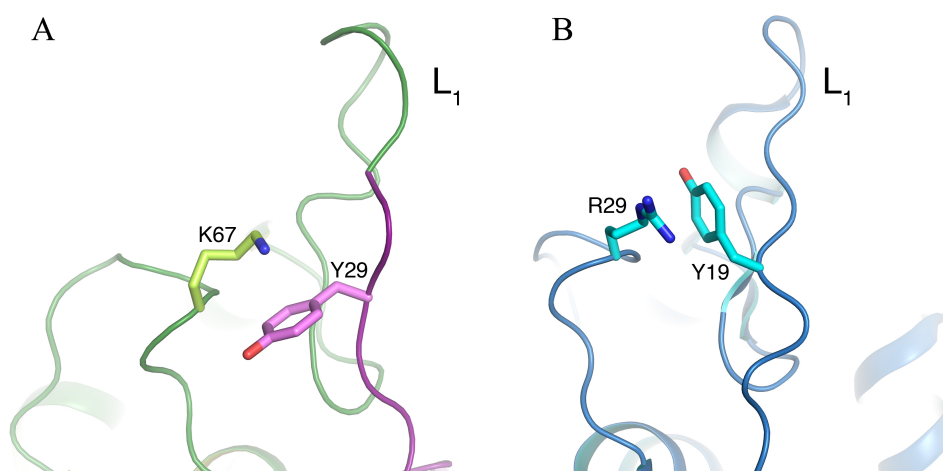


Figura 4.45. Empaquetamiento de la tirosina conservada en la secuencia EGGY, en los lazos catalíticos de Gp61 (A) y Lys^{Nm} (B). (A) En Gp61 la Tyr29 se empaqueta con la Lys67 de la región variable. (B) Mientras que en Lys^{Nm}, su homóloga la Tyr19, se empaqueta con la Arg29 de su correspondiente región variable. Es destacable cómo el empaquetamiento, por interacción de tipo catión- π , es más fuerte (menor distancia) en Lys^{Nm}. La distancia media del lazo, donde se encuentran la Lys (A) y la Arg (B), respecto de L₁, es significativamente menor en Lys^{Nm}.

Por otra parte, el empaquetamiento de residuos altamente conservados como la tirosina de la secuencia EGGY, también difiere entre ambas estructuras, Gp61 y Lys^{Nm} (Figura 4.45). La Tyr19 en Gp61, establece una interacción de tipo catión- π con la cadena lateral de la Lys67 (figura 4.45 A). Esta lisina forma parte de la región variable. En el caso de Lys^{Nm} su homóloga, la Tyr29, también establece una interacción del tipo catión- π , a través de su anillo bencénico con el grupo guanidinio de la Arg49 (figura 4.45 B). Sin embargo, esta última interacción es evidentemente más cercana. La Arg49 forma parte de la correspondiente región variable en Lys^{Nm}.

4.2.7. Estructura cuaternaria. Dimerización de Gp61

La unidad asimétrica de los cristales de Gp61 contiene un dímero cristalográfico. Este dímero (figura 4.46 A), interactúa por una región amplia de aproximadamente 1001.5 Å² por monómero; estableciendo varios puentes de hidrógeno y puentes salinos (figuras 4.46 y 4.47). La totalidad de las interacciones polares que se establecen en el dímero, se resumen en la tabla 4.10.

Tabla 4.10. Interacciones polares entre los monómeros de Gp61

Nº	Residuos monómero B	Distancia (Å)	Residuos monómero A
Puentes de hidrógeno			
1	Asn175 (ND2)	3.30	Gly171 (O)
2	Asn175 (ND2)	2.39	Asn175 (OD1)
3	Arg127 (NE)	3.02	Glu184 (OE2)
4	Lys167 (NZ)	3.07	Ala191 (O)
5	Lys167 (NZ)	3.11	Ile194 (O)
6	Glu184 (OE1)	2.93	Arg127 (NE)
7	Ile190 (O)	3.04	Lys167 (NZ)
8	Ala191 (O)	3.09	Lys167 (NZ)
9	Ile194 (O)	2.69	Lys167 (NZ)
Puentes salinos			
1	Arg127 (NH1)	2.96	Glu184 (OE1)
2	Arg127 (NH1)	2.94	Glu184 (OE2)
3	Glu184 (OE1)	3.00	Arg127 (NH2)
4	Glu184 (OE2)	2.76	Lys130 (NZ)

Entre paréntesis se especifica el átomo involucrado

Tabla 4.11. Residuos que conforman la superficie de interacción entre los monómeros

Nº	Residuos monómero B	Residuos monómero A
1	Ser121	Ser121
2	Ala124 (EH)	Ala124 (EH)
3	Phe125 (EH)	Phe125 (EH)
4	Arg127 (PS)	Arg127 (PS)
5	Asn128	Asn128
6	Lys130	Lys130 (HS)
7	Lys134	Lys134
8	Arg156	Arg156
9	Leu164 (EH)	Leu164 (EH)
10	Lys167 (PH)	Lys167 (PH)
11	Ser168	Ser168
12	Gly171	Gly171
13	Lys172	Lys172
14	Leu174 (EH)	Leu174 (EH)
15	Asn175 (PH)	Asn175 (PH)
16	Leu178 (EH)	Leu178 (EH)
17	Ans181	Ans181
18	Pro183 (EH)	Pro183 (EH)
19	Glu184 (PS)	Glu184 (PS)
20	Thr186	Thr186
21	Thr187	Thr187
22	Ile190 (PH/EH)	Ile190 (EH)
23	Ala191 (PH/EH)	Ala191 (PH/EH)
24	Ile194 (PH/EH)	Ile194 (PH/EH)
25	Gly195	Gly195
26	Leu199 (EH)	Leu199 (EH)

Entre paréntesis se indica el tipo de interacción en el que está involucrado:

Puente de hidrógeno (PH)

Puente salino (PS)

Empaquetamiento hidrofóbico (EH)

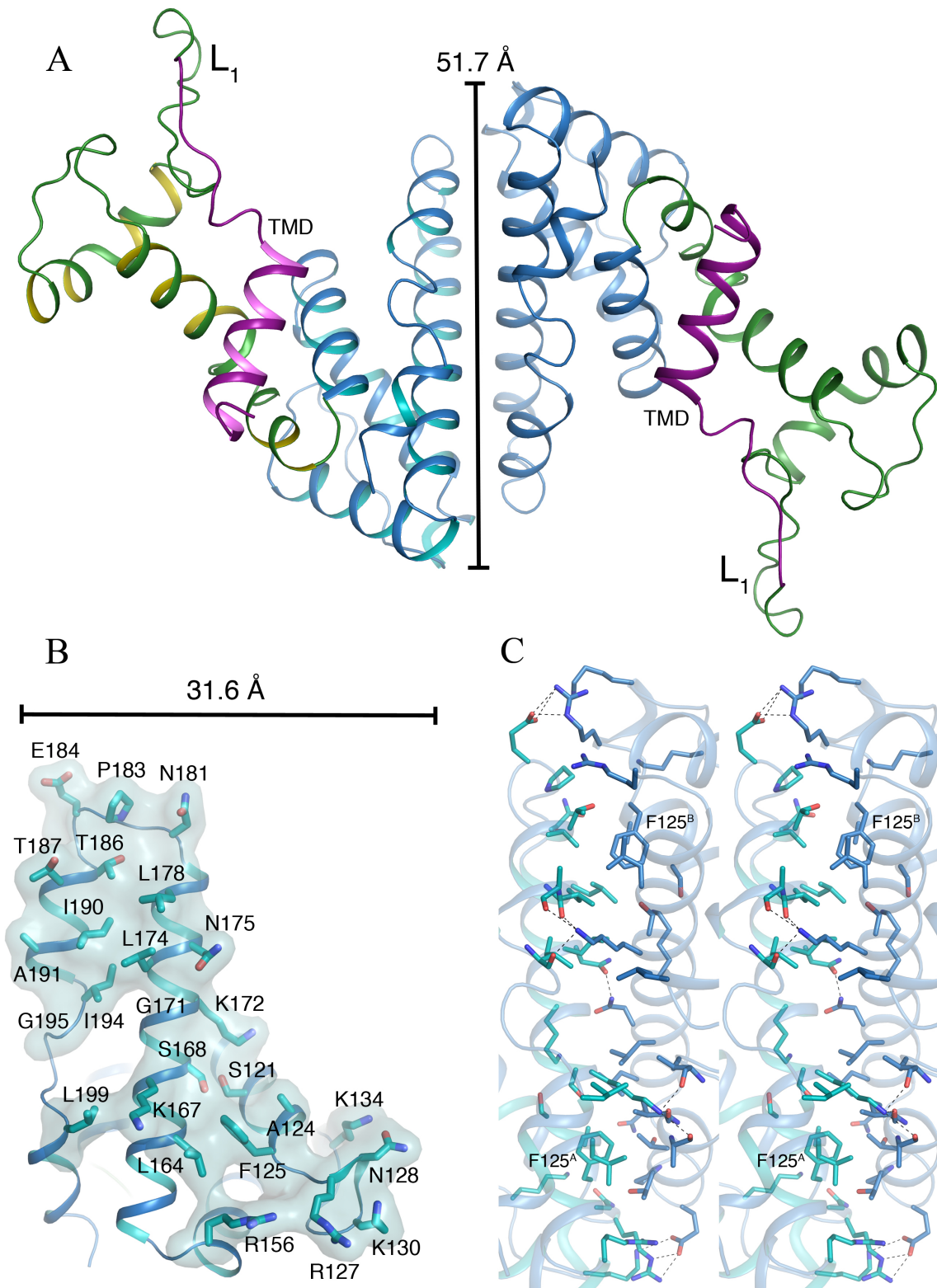


Figura 4.46. Dímico cristalográfico de Gp61. (A) Disposición general del dímico de Gp61; los monómeros interactúan a través de la región C-terminal (dominio de unión a PG). Los dominios transmembrana (DTM) en magenta, de ambos monómeros, quedan dispuestos sobre la misma cara frontal. (B) Superficie y residuos involucrados en la conformación del dímico. En esta superficie participan las hélices α_5 , α_6 , α_7 , α_8 y las hélices $3_{10}(2)$ y $3_{10}(3)$. (C) Imagen estereoscópica del detalle de la superficie de interacción entre monómeros. En ella se resaltan, los residuos (barras) y las interacciones polares (líneas negras discontinuas). Alrededor de la Phe125 (de ambos monómeros), se crean dos núcleos hidrofóbicos simétricos que fortalecen la interacción. A través de la superficie de interacción se alternan núcleos polares e hidrofóbicos.

Interesantemente, la interacción entre los monómeros se sucede por la misma región (dominio de unión a PG), dejando libre el dominio DTM. Aún más importante, es el hecho de que la totalidad de los residuos involucrados son exactamente los mismos en cada monómero (tabla 4.11). Las interacciones (polares e hidrofóbicas) involucran a los mismos residuos, y además de forma simétrica (figura 4.46 B y C). El número de residuos que conforman la interfase asciende a 26 por monómero (12.1% del total). La región de interacción incluye las hélices α_5 , α_6 , α_7 , α_8 , $3_{10}(2)$ y $3_{10}(3)$.

La interfase contiene un total de 9 puentes de hidrógeno y 4 puentes salinos, y a lo largo de la zona de interacción (unos 51.7 Å) se intercalan zonas con un cúmulo de interacciones polares y núcleos hidrofóbicos. Dentro de estas interacciones hidrofóbicas, resaltan dos núcleos fuertes alrededor de las correspondientes Phe125 de cada monómero (figura 4.46 C). Por su parte los puentes salinos, aunque presentan una pequeña variación, también son simétricos y se encuentran en los extremos de la zona de formación del dímero (figura 4.47).

El análisis del dímero con el servidor *PISA* (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html), arrojó una correlación de significado de formación del complejo (CCS score) de 1. Esta correlación que va de 0 a 1, indica la importancia de la interfase analizada para la formación de un dímero estable en solución.

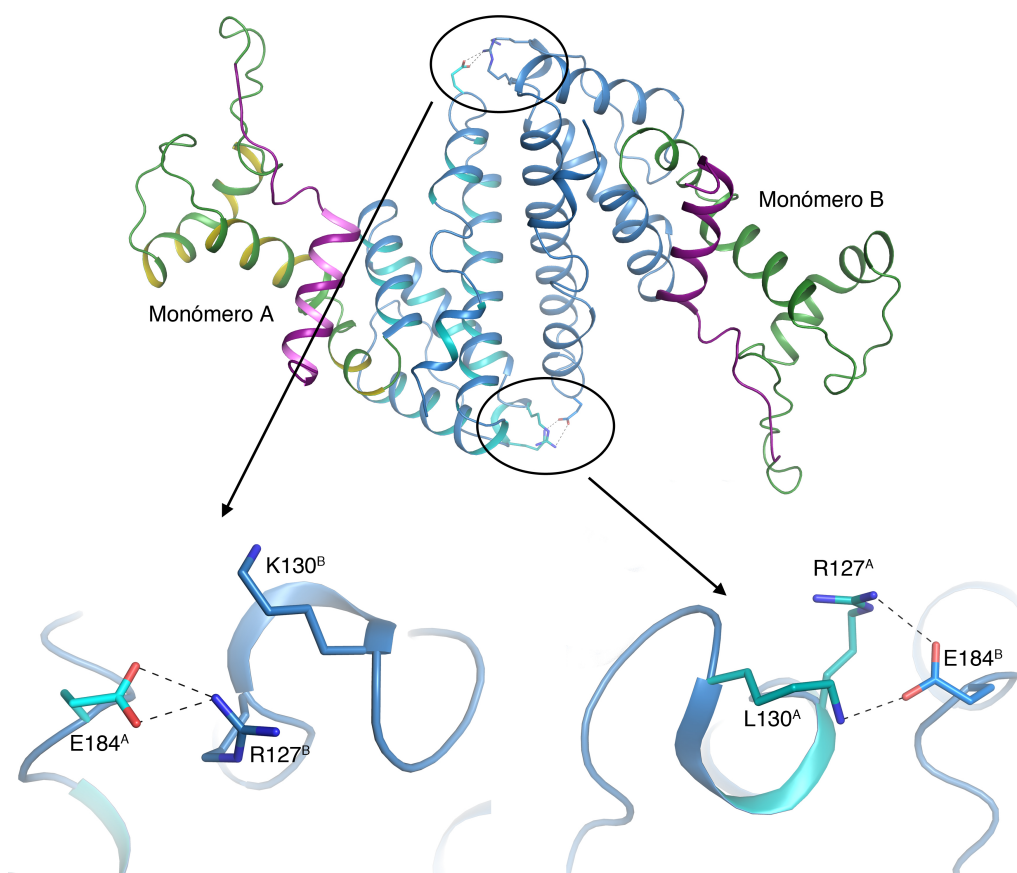


Figura 4.47. Puentes salinos formados en la interfase de interacción de los monómeros de Gp61. Aunque existe una pequeña variación entre ambos extremos, los residuos involucrados son los mismos.

4.2.7.1. Ultracentrifugación Analítica por velocidad de sedimentación

Con el fin de profundizar el estudio sobre el comportamiento de la estructura cuaternaria de Gp61 en solución, se realizó una ultracentrifugación analítica por

velocidad de sedimentación. El ajuste obtenido para la distribución de los coeficientes de sedimentación, fue consistente con la presencia de una especie mayoritaria bajo las condiciones analizadas (0.8 mg/ml de proteína en 20 mM de Tris pH 8.5, 200 mM de NaCl). Esta especie, caracterizada por un peso molecular de 46891 Da y un $S_w = 3.3$ S, se correspondió con el dímero. Las especies presentaron una relación 0.02/0.97 monómero/dímero (figura 4.48). Además apareció otro pico minoritario correspondiente al peso de un posible tetrámero (con una proporción menor al 0.05%). El valor de f/f_0 fue superior a 1, indicando que el comportamiento del dímero en solución se aleja del esperado para una partícula esférica.

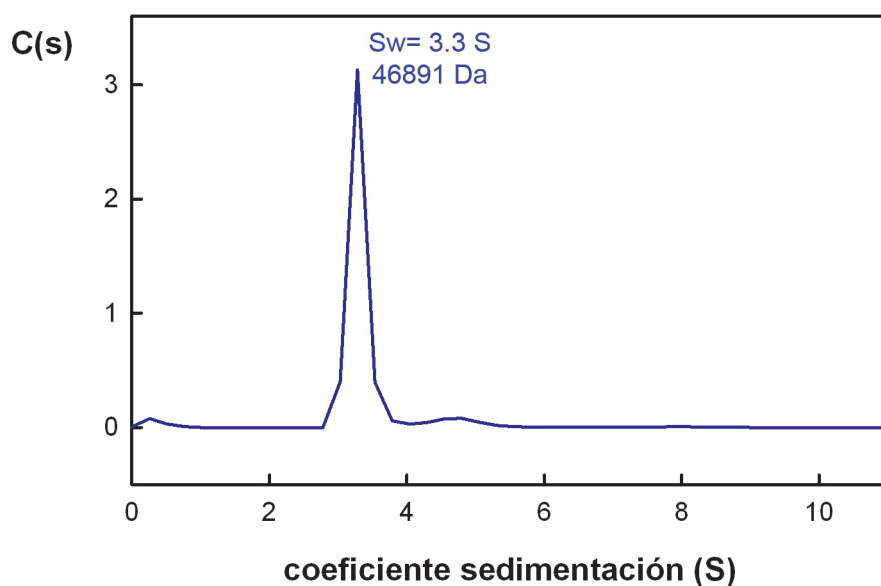


Figura 4.48. Distribución de la probabilidad de los coeficientes de sedimentación (S) para la solución de Gp61 pura. C(s) en el eje de las ordenadas indica la distribución de las probabilidades de los coeficientes de sedimentación. En el eje de las abscisas se representan los coeficientes de sedimentación.

5. DISCUSIÓN

5.1. ESTRUCTURA GENERAL DE AMPD

La estructura cristalográfica de AmpD fue resuelta por la técnica MAD, utilizando un derivado de selenio-metionina. También se resolvieron las estructuras, de la holoenzima, la apoenzima, el complejo con los productos de la reacción **3** y **4** (anhMurNAc y *L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP respectivamente) y la holoenzima en una condición de cristalización tamponada a pH 5.5 (a diferencia del valor de pH de 6.0 para el resto de las estructuras). El modelo tridimensional de AmpD presenta el plegamiento característico de las proteínas de unión a peptidoglicano (PGRPs), y esencialmente el de la familia amidasa_2 (Ghuysen *et al.*, 1969; Herbold & Glaser, 1975). Esta familia (PF01510), incluye a las *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasas dependientes de Zn^{2+} que hidrolizan el peptidoglicano, separando el azúcar del péptido, y que tiene una amplia representación en el reino animal, desde bacterias hasta mamíferos, pero también en virus y bacteriófagos (Cheng *et al.*, 1994; Liepinsh *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2006; Kerff *et al.*, 2010).

La región móvil r2 es la principal diferencia estructural entre AmpD y la gran familia de las PGRPs, donde se sustituye por una única hélice de mayor tamaño (figura 4.13) estabilizada en los flancos por un par de puentes disulfuro, altamente conservados en las PGRPs (figura 4.13).

Los diferentes modelos cristalográficos de AmpD aquí resueltos no presentan diferencias significativas en su estructura global. De hecho, la superposición de todas ellas presenta un RMSD de 0.14 Å (figura 4.3 A). Sorprendentemente, la estructura cristalográfica muestra enormes diferencias respecto a la resuelta por RMN (RMSD de 3.9 Å). La regiones afectadas están directamente involucradas en el reconocimiento del sustrato, por lo que se postula un mecanismo de activación para esta amidasa. Este mecanismo no tiene precedentes en la literatura y representa uno de los mayores movimientos, quizás el mayor, reportado para proteínas de un sólo dominio.

5.1.1. La coordinación del Zn^{2+} en AmpD y el efecto del pH en la estructura de AmpD

La presencia del sustrato no parece ser responsable de la activación en AmpD, ya que, tanto la holoenzima como el complejo con los productos de la reacción, muestran la misma estructura. Se buscaron diferencias entre las condiciones de RMN (estructura inactiva) y de rayos X (estructura activa) que se pudiesen correlacionar con los cambios observados en sus estructuras. Así, se encontró que una diferencia importante era el valor de pH de las condiciones de disolución de las proteínas. Por esta razón, y tomando en cuenta que las variaciones del pH afectan de manera directa la coordinación de los metales (Vallee & Auld, 1992a y 1992b; McCall *et al.*, 2000), se estudió el efecto del mismo intentando establecer algún tipo de correlación entre el pH, la coordinación del metal y las diferencias conformacionales observadas entre ⁱAmpD y ^aAmpD.

Los experimentos de absorción de rayos X (XAS y EXAFS) permitieron determinar la presencia de hasta tres entornos diferentes para la coordinación del metal

en función del pH. Las estructuras a pH 7.0 y 8.2 son similares, mientras que la coordinación del metal a pH 6.0 concuerda con la estructura cristalográfica de AmpD (^aAmpD). Por su parte, la coordinación del metal analizada a pH 5.6, concuerda con la estructura reportada para AmpD-RMN (ⁱAmpD). Por tanto, estos resultados confirman las diferencias observadas para la coordinación del metal por las distintas técnicas de resolución atómica (rayos X y RMN). También presentan diferencias estructurales los modelos cristalográficos a pH 5.5 y pH 6.0. Sin embargo, estas diferencias no tienen la magnitud del cambio observado entre las estructuras de ⁱAmpD y ^aAmpD (figura 4.28).

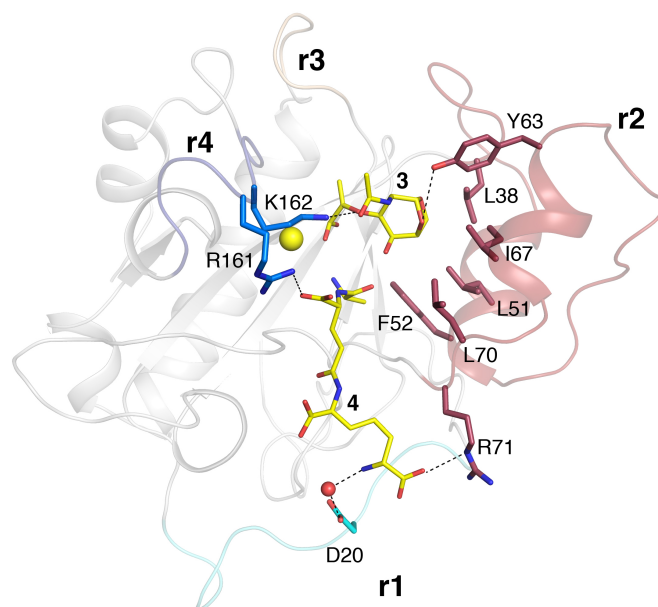


Figura 5.1. Relación estructural entre las regiones móviles de AmpD y la coordinación del sustrato. En la imagen se muestran los residuos involucrados en la coordinación del sustrato y que además pertenecen a las regiones móviles.

5.1.2. Reconocimiento del sustrato en la forma activa AmpD

Los cristales de la holoenzima son capaces de hidrolizar el sustrato **2** tras sumergirlos en una solución de cristalización suplementada con este compuesto. La obtención del complejo cristalográfico de AmpD con los productos de la reacción, ha permitido por primera vez definir y caracterizar el sitio activo (figuras 4.12 y 4.14), además de confirmar al Glu116 como el residuo catalítico (figura 4.17). Hasta un total de 21 residuos (figura 4.14) participan directamente en la estabilización de los productos 1,6-anhMurNAc (**3**) y *L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP (**4**). De estos residuos, una parte importante se compone de aminoácidos hidrofóbicos, los cuales conforman la superficie que brinda el soporte necesario para acomodar el producto **3** (figura 4.14). También se observan interacciones polares, y en particular tres residuos (Asn35, Lys162 y Tyr63) son críticos en la orientación del producto **3** a través de puentes de hidrógeno. Estas interacciones, como se explicará en detalle en el apartado 5.3.2, se encuentran en concordancia con los resultados de los ensayos de mutagénesis previamente publicados (Généreux *et al.*, 2004).

El péptido *L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP, se estabiliza principalmente por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (figura 4.14). De forma interesante, la Arg71 interacciona con el ácido diaminopimélico a través del nitrógeno NH de su grupo guanidinio y no por los aminos cargados (figura 4.14). La presencia de Asp o Arg en esta posición, ha

sido señalado como crítico en la especificidad por Lys o DAP, en la tercera posición de la cadena peptídica de los ácidos murámicos, en PGRP-SA y PGRP-SD respectivamente (Chang *et al.*, 2004; Leone *et al.*, 2008).

La estructura tridimensional de AmiD, una anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa periplásmica de *E. coli*, ha sido recientemente descrita en complejo con su sustrato, el anhMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*L*-Lys (Kerff *et al.*, 2010). AmpD y AmiD poseen un patrón similar de interacción proteína-ligando (figura 4.19). Sin embargo las regiones r2 y r3 no están presentes en esta amidasa, mientras que la región r4 conserva una estructura idéntica (figura 4.19 A). Otro aspecto importante a resaltar, es que AmiD posee un sitio de unión al sustrato menos restrictivo estructuralmente que el de AmpD, por la ausencia de la región r2 (figura 4.19 A). Esto podría explicar la poca especificidad de AmiD entre los compuestos **1** (disacárido) y **2** (monosacárido) y la especialización de AmpD por el compuesto **2** (Park, 1993; Jacobs *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1995; Génèreux *et al.*, 2004; Kerff *et al.*, 2010).

Muchos de los residuos implicados en la coordinación del sustrato pertenecen a las regiones móviles (tabla 4.4 y figuras 4.18 y 5.1), de forma que el proceso de activación es necesario para la creación del sitio de unión al muropéptido. Este hecho refuerza la verosimilitud del proceso de activación descubierto en AmpD, cuyos extremos (conformaciones activa e inactiva) se ven representados por las estructuras de rayos X y RMN. La gran mayoría de los residuos que pertenecen a las regiones móviles se concentran en la región r2 (la más extensa) (figura 5.1), y éstos definen la especificidad de AmpD por el compuesto **2**, especialmente por la región del biciclo sacárido (figura 4.14).

5.2. REESTRUCTURACIÓN DE AMPD: ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA

La estructura de AmpD obtenida por RMN (¹AmpD) carece de una conformación estructural que permita unir ambos, azúcar y péptido. De hecho, algunos residuos se encuentran, en ¹AmpD, a más de 20 Å de distancia respecto de la posición en la estructura de ³AmpD. Los cambios conformacionales entre ambas estructuras, implican una reorganización compleja de las regiones móviles, tanto en la cadena principal como en las laterales, incluyendo la reestructuración de redes de puentes salinos (figuras 4.22 y 4.25). Buena parte de estas interacciones electrostáticas se establecen con el Glu42 del lazo ³⁹PPGEFGGP⁴⁶, una zona de características particulares que puede desempeñar un rol importante en el proceso de activación (figuras 4.23). El movimiento general involucra regiones que se encuentran inicialmente inconexas en la estructura de ¹AmpD (r2, r3 y r4), pero que convergen estructuralmente hasta encontrarse en contacto de forma directa (r3···r4), o a través del ligando (r2···r4) en ³AmpD (figuras 4.26 y 5.1). Por el contrario, otras regiones (r1 y r2) que se encontraban en contacto directo en la estructura inactiva (figura 4.22 A), rompen sus conexiones para ofrecer espacio al péptido (**4**) y finalmente participan en una coordinación conjunta del sustrato (figura 4.22 C).

El desplazamiento del lazo ³⁹PPGEFGGP⁴⁶, de la región r2 y que presenta los mayores RMSD observados, parece “empujar” a la región r3. Esta región, a su vez, ayuda a estabilizar r4 en la conformación activa (figura 4.26 B). De esta forma puede conectarse en el mecanismo de reestructuración a las regiones r2, r3 y r4. Finalmente las regiones r1, r2 y r4, interactúan a través de todas las conexiones que establecen con el

ligando (figura 5.1). Como se mencionó, el bucle $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$ parece aportar claves importantes en el proceso de reestructuración. Los residuos Gly41, Gly44 y Gly45 proveen de flexibilidad a la cadena peptídica, mientras que las primeras dos prolinas, Pro39 y Pro40, por el contrario, aportan rigidez. Dichas prolinas cambian la configuración de su grupo amina de *cis* a *trans* y de *trans* a *cis* respectivamente, durante la transición entre ambos estados conformacionales. Este comportamiento también se observa en la activación interfacial de las lipasas (Brzozowski *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1994). Aún mas llamativo es el Glu42 presente en medio de la secuencia, que funciona como pivote del bucle y en gran medida de la región r2 (figura 4.25). Otro aspecto interesante radica en que la red electrostática de la conformación inactiva (figura 4.25 A), reúne hasta cuatro argininas (R12, R13, R79 y R80), formando una región fuertemente electropositiva (figura 5.3). Como se verá más adelante, esta característica permite especular sobre los posibles desencadenantes del proceso de activación de AmpD.

La presencia del ión metálico no es un requerimiento necesario para mantener la estructura activa de la enzima, puesto que se observó la misma disposición general en la holoenzima y en la apoenzima.

La región r2 es única de las AmpD bacterianas. La ausencia de la misma, y la flexibilidad limitada por los puentes disulfuro presentes en las PGRPs (figura 4.13), podría indicar que el mecanismo de activación evidenciado en AmpD, es una particularidad de las AmpD bacterianas. Un análisis comparando las secuencias génicas (ver anexos), indicó que las regiones móviles de AmpD se conservan en las *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasas bacterianas con ubicación subcelular citosólica.

5.2.1. Transición conformacional entre los estados inactivo y activo analizada por TMD

La simulación por dinámica molecular reveló una ruta plausible entre los dos estados conformacionales de AmpD (figura 4.27 y videos 1 y 2). Inicialmente se suceden cambios drásticos en el posicionamiento de las hélices α_1 y α_2 (región r2), acompañados del desplazamiento de la región r4 (figura 4.23). Los cambios de la región r2, parecen inducir el gran movimiento que despliega el bucle $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$ y especialmente el deslizamiento del residuo hidrofóbico Phe43. Este residuo parece ser clave en el desplazamiento del Glu42 fuera de la red electrostática de la conformación inactiva y el posterior movimiento de la región r3. La ruptura de esta fuerte red electrostática, libera al bucle $^{39}\text{PPGEFGGP}^{46}$, permitiendo el amplio movimiento observado. Toda esta información, en conjunto con el análisis detallado de las dos estructuras, provee un contexto estructural de cómo AmpD puede experimentar una transición conformacional entre los dos estados, con una barrera energética modesta, dado la baja constante de fuerza (por debajo de $0.06 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$) requerida para conducir el cambio conformacional por TMD.

5.3. LAS ESTRUCTURAS CRISTALOGRÁFICAS DE AMPD EXPLICAN LOS DATOS BIOQUÍMICOS PRECEDENTES

5.3.1. Ubicación estructural y contexto funcional de las mutaciones de diversas *Enterobacteriaceae* que afectan la actividad de AmpD

Actualmente, la causa más común de sobreexpresión de AmpC, la β -lactamasa capaz de hidrolizar los antibióticos β -lactámicos, en diversas *Enterobacteriaceae* resistentes a β -lactámicos y sus derivados, es alguna mutación en *ampD* (el gen de AmpD) (Schmidtke & Hanson, 2006). Dichas mutaciones han sido aisladas en casos clínicos y tienen como fenotipo la hiperinducibilidad o la producción constitutiva de AmpC (Lindberg *et al.*, 1987; Jacobs *et al.*, 1995, Jacobs *et al.*, 1997). Todas ellas, que han sido mapeadas a lo largo del gen *ampD*, no necesariamente afectan la expresión de la enzima (Petrosino *et al.*, 2002).

Tabla 5.1. Mutaciones puntuales que afectan la actividad de AmpD en diversas enterobacterias, y su contexto estructural y funcional

Residuo	Región	¿Cambio entre las conformaciones inactiva y activa? (RMSD C α /cadena lateral en Å)	Explicación estructural
Trp7	-	Sí (3.8/2.7)	Involucrado en la estabilización del lazo entre β_1 y β_2 .
Val33	-	No	Perteneciente al núcleo de la proteína
Ser37	r2	Sí (3.9/6.1)	Esta mutación bloquearía el movimiento de del lazo ³⁹ PPGEFGGP ⁴⁶
Arg80	-	Sí (2.1/7.0)	Esta mutación interfiere en la conformación de la red de puentes salinos en la estructura activa.
Gly82	-	No	Esta mutación interfiere en la conformación de la red de puentes salinos.
Glu83	-	Sí (1.9/4.0)	Esta mutación interfiere en la conformación de la red de puentes salinos.
Ala94	-	No	Esta mutación interfiere en la estabilización del péptido (4).
Trp95	-	Sí (1.9/7.6)	Esta mutación interfiere en la estabilización del péptido (4).
Tyr102	-	Sí (2.7/4.8)	Esta mutación interfiere con el movimiento de la región r4.
Leu117	-	No	Perteneciente al núcleo de la proteína
Asp121	r3	Sí (7.7/10.0)	Esta mutación interfiere con el movimiento de la región r3. Este residuo forma un puente de hidrógeno con la Thr163 en la conformación abierta.
Asp127	-	No	Este residuo está involucrado en un puente salino con la Arg173.
Ala134	-	No	Perteneciente al núcleo de la proteína
Ala146	-	No	Perteneciente al núcleo de la proteína
Ala158	r4	Sí (8.6/9.3)	Esta mutación podría impedir el movimiento de la región r4 e imposibilitar, por tanto, la estabilización del sustrato por parte de los residuos Arg161 y Lys162.
Asp164	r4	No	Residuo involucrado en la estabilización del ión metálico.
Trp171	-	No	Residuo involucrado en la estabilización de la región r4.
Ala172	-	No	Esta mutación bloquearía la formación del puente salino Asp121...Arg173. Este puente es importante en la estabilización de la región r4.

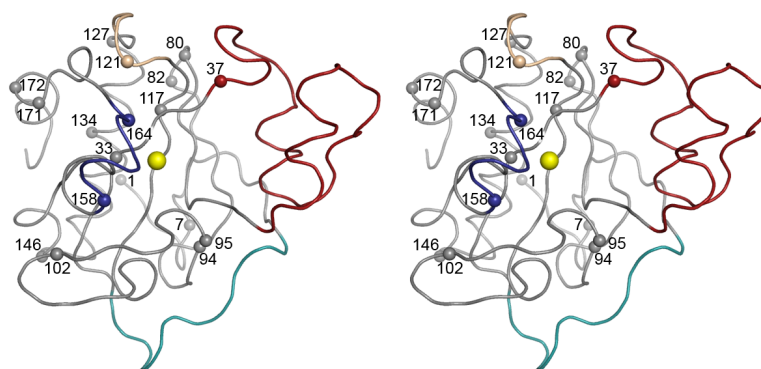


Figura 5.2. Ubicación estructural de las mutaciones puntuales que afectan a la actividad de AmpD en distintas enterobacterias. La imagen en estéreo, muestra la ubicación de los residuos (esferas) cuyas mutaciones afectan la actividad de AmpD según el trabajo de Petrosino *et al.* (2002). La estructura representa la cadena principal. Los colores de la cadena principal indican las regiones móviles de AmpD, r1 (cian), r2 (rojo), r3 (marrón) y r4 (azul oscuro). La esfera amarilla representa el ión de Zn^{2+} .

Una compilación de mutaciones en 9 enterobacterias identificó hasta 19 residuos capaces de inactivar AmpD (Petrosino *et al.*, 2002; Liepinsh *et al.*, 2003), lo que deriva en una expresión constitutiva (o en la hiperinducibilidad) de β -lactamasa. La información extraída sobre el proceso de activación de AmpD (la comparación entre i AmpD y a AmpD), puede ahora explicar la relevancia de estos aminoácidos. En la figura 5.2 se muestra la ubicación en la cadena peptídica de las diversas mutaciones, y se identifican las regiones móviles del proceso de activación (r1, r2, r3 y r4); y como se resume en la tabla 5.1, la mayoría están implicadas: (i) de forma fundamental en el proceso de reestructuración necesario para la transición entre la conformación inactiva y activa; (ii) en la conformación de redes de puentes salinos o de hidrógenos importante para la estabilización de la conformación activa; o (iii) en la interacción con el sustrato en la conformación activa. La existencia de mutaciones que “bloquean” o desestabilizan los cambios estructurales, necesarios para la adopción de la conformación capaz de unir e hidrolizar el sustrato, representa otra evidencia de la existencia de dos estados funcionales en AmpD. Otras evidencias bioquímicas de estudios mutacionales directamente estudiadas con AmpD de *C. freundii* (Généreux *et al.*, 2004), también pueden ser explicadas por la estructura activa de AmpD y su mecanismo de activación.

5.3.2. Explicación estructural del estudio mutacional de AmpD de *Citrobacter freundii*

De igual forma que en el caso de las mutaciones en diversas *Enterobacteriaceae*, el complejo cristalográfico de AmpD con los productos de la reacción **3** y **4**, explica estructuralmente la reducción (o pérdida completa) de actividad, como consecuencia fenotípica de varias mutaciones realizadas sobre la AmpD de *C. freundii* (Généreux *et al.*, 2004). La tabla 1.1, muestra las propiedades catalíticas de los mutantes comparadas con la actividad de la enzima salvaje. En esta tabla se observa que, además de las mutaciones de los residuos involucrados en la coordinación del metal (figura 4.4), que producen la completa inactivación de la enzima, otros tres mutantes presentaron una atenuación importante de la actividad (Y63A y K162 mutada por Q y H) o la pérdida total de la capacidad hidrolítica del mutante (E116A).

En el complejo cristalográfico de AmpD, la Tyr63 y la Lys162 están involucradas en la estabilización del compuesto **3** (azúcar) (figura 4.14). De esta forma, la estructura activa de AmpD, demuestra que ambos residuos cumplen un papel esencial

en la coordinación del sustrato, en concordancia con los resultados bioquímicos (Généreux *et al.*, 2004). Otra mutación cuyo fenotipo (inactividad total) se esclarece con el proceso de activación de AmpD, es la que involucra al Glu116 (E116A). Como se confirmó estructuralmente, el Glu116 es el ácido catalítico que participa en la escisión del enlace entre el AnhMurNAc y el péptido (figuras 4.14 y 4.17). Esto concuerda nuevamente, con los resultados del trabajo de Généreux *et al.* (2004). Así, la forma activa de AmpD aclara el mecanismo catalítico de la enzima.

5.4. APROXIMACIONES AL DESENCADENANTE DE LA ACTIVACIÓN

La compleja transición conformacional entre una estructura inactiva, ⁱAmpD, y otra que posee un sitio activo completamente constituido, ^aAmpD, muestra un mecanismo de activación sin precedentes para una peptidasa/proteasa dependiente de zinc. La ubicación del mismo dentro de un contexto biológico/funcional de la célula, conlleva a plantear preguntas fundamentales. Por un lado, ¿por qué se requiere de un mecanismo de activación semejante?, es decir, ¿cuál es la necesidad fisiológica que impulsó la evolución de dicho mecanismo? Y en otro orden de ideas, ¿qué desencadena el mecanismo de activación?, o ¿cuáles son las claves que encienden/apagan el sistema de activación de AmpD? Estas preguntas se encuentran, por ahora, sin suficiente explicación experimental. En esta sección se especula, en base a algunos resultados y evidencias, sobre las posibles respuestas a dichos planteamientos.

5.4.1. ¿Por qué un mecanismo de activación en AmpD?

AmiD, es una anhidro-*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa periplásmica de *E. coli* y pertenece a la familia amidasa_2, al igual que AmpD. Su estructura cristalográfica ha sido recientemente descrita en complejo con su sustrato, el anhMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*L*-Lys (Kerff *et al.*, 2010) y, como se mencionó anteriormente, presenta la mayor similitud estructural observada (figura 4.19). Sin embargo, carece de la mayor parte de las regiones (excepto por la región r4) involucradas en los cambios conformacionales que sufre AmpD en su proceso de activación.

AmpD es una enzima citosólica, y aunque ambas (AmpD y AmiD) hidrolizan los mismos sustratos (con distintas afinidades), cumplen funciones de regulación distintas debido a su ubicación subcelular (Jacobs *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1995; Pennartz *et al.*, 2007; Uehara & Park, 2007). Además, hay que agregar que el mecanismo catalítico dependiente de Zn^{2+} que ha sido observado en AmpD y AmiD, es exactamente el mismo presente en muchas proteasas dependientes de este mismo metal (revisado en Hooper 1994 y McCall *et al.*, 2000). Por tanto es muy posible que AmpD (y también AmiD) pueda tener algún tipo de actividad proteolítica residual. En el caso de AmiD, al ser una lipoproteína, esta actividad proteolítica residual no afectaría a la célula debido a su restricción de movimientos, ya que no se encuentra soluble. Sin embargo, para proteger la integridad de las proteínas y mantener el equilibrio funcional del citoplasma, un mecanismo de activación podría ser beneficioso, e incluso requerido en AmpD. Para regular la proteólisis, una estrategia común en la naturaleza es la activación de un zimógeno, algo que típicamente requiere de la eliminación proteolítica de un segmento de la estructura primaria, para hacer completamente accesible el sitio

activo de la enzima y permitir así que cumpla con su función biológica (Berg *et al.*, 2002). Este tipo de regulación no se observa en el proceso de activación de AmpD, pero el sistema reversible de activación mediado por la transición entre ⁱAmpD y ^aAmpD podría muy bien funcionar como mecanismo de regulación en este sentido, evitando los posibles daños al entorno citosólico que un sitio activo con capacidad proteolítica pudiese causar.

La familia amidasa_2, incluye PGRPs altamente conservadas desde bacterias, pasando por insectos, hasta mamíferos (Cheng *et al.*, 1994; Liepinsh *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2006; Kerff *et al.*, 2010). Muchas de estas enzimas exhiben distintas especificidades por el peptidoglicano. Además, una gran parte de ellas posee un sitio de unión a Zn²⁺ con una actividad amidasa asociada. Un análisis de secuencias reveló que las regiones involucradas en el mecanismo de activación (especialmente la región r2) se conservan en todas las AmpD bacterianas citosólicas y también en algunas PGRPs intracelulares con actividad peptidasa, de organismos superiores. Mientras que todas las enzimas periplásmicas relacionadas (similares a AmiD) o extracelulares (en organismos superiores) no conservan las regiones móviles.

5.4.2. ¿Qué podría disparar el mecanismo de activación de AmpD?

El evento que desencadena el mecanismo de activación de AmpD, es actualmente desconocido. Mientras, que en algunas carboxipeptidasas dependientes de Zn²⁺, la presencia del ligando produce un movimiento de tipo bisagra entre dos subdominios (Towler *et al.*, 2004); los resultados obtenidos para AmpD (una misma estructura cristalográfica con o sin ligando) apuntan a la existencia de algún mecanismo alostérico que desencadene la activación.

En ⁱAmpD existe una región que agrupa un buen número de residuos cargados positivamente (R12, R13, R79 y R80) (figura 5.3). Esta región concentra la mayoría de los residuos básicos que no se encuentran involucrados en la coordinación del ligando en ^aAmpD. Curiosamente, estos residuos (R12, R79 y R80) son parte de la red electrostática de ⁱAmpD en la cual el Glu42 del bucle ³⁹PPGEFGGP⁴⁶, se encuentra anclado (figuras 4.25 y 4.27). Esta región podría interactuar con la cara interna de la membrana plasmática, como se ha reportado en proteínas capaces de censar y unirse a la membrana y que poseen regiones muy similares, los dominios BAR (Zhu *et al.*, 2007; Reider *et al.*, 2009). La interacción con la membrana puede desestabilizar la red de puentes salinos que mantiene la conformación inactiva, suministrando la energía necesaria para desencadenar la transición. Así, AmpD, a pesar de ser una proteína soluble podría interactuar transitoriamente con la membrana y activarse, estando cerca de la proteína integral de membrana AmpG, la cual se encarga del transporte de los sustratos de NagZ y AmpD al citosol. En este trabajo se ha documentado que ambos parámetros, K_m y K_{cat} , se ven incrementados en la presencia de vesículas de membranas obtenidas a partir de extractos lipídicos bacterianos (tabla 4.6).

Las propias condiciones de cristalización (una alta concentración de enzima), y el gran número de interacciones proteína-proteína que mantienen la integridad del cristal, permiten también pensar en una activación mediada por este tipo de interacciones. La posibilidad de complejos multiproteicos bien consigo misma, o con proteínas relacionadas con el mismo contexto fisiológico (el reciclaje de la pared), como AmpG, AmpE, o NagZ no ha sido aún explorada. Sin embargo, estas aproximaciones

podrían aportar información interesante, y sobre todo respuestas concretas al desencadenante del mecanismo de activación de AmpD.

En resumen, las estructuras resueltas por Cristalografía de rayos X muestran claramente la conformación activa de la AmpD de *C. freundii*, capaz de unir e hidrolizar el sustrato de esta enzima. Sorprendentemente esta estructura es distinta del modelo previamente determinado por RMN, que exhibe una conformación incapaz de unir el sustrato. El modelo activo de AmpD explica la información bioquímica precedente, que no pudo ser entendida a través del modelo de RMN. Cálculos de dinámica molecular, sugieren una vía plausible de cómo puede suceder la transición entre las estructuras inactiva y la activa. Este mecanismo de activación sin precedentes, podría ocurrir también entre los miembros bacterianos e intracelulares de la familia amidasa₂.

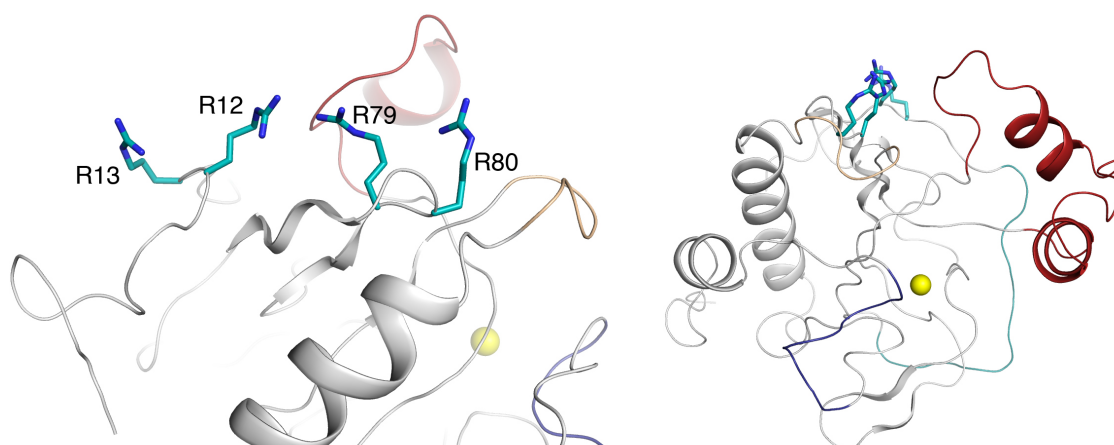


Figura 5.3. Región rica en residuos con carga positiva en la estructura inactiva de AmpD. Las argininas 12, 79 y 80, además están involucradas en la conformación de la red de puentes salinos que se rompe en el proceso de activación (ver figura 4.25).

5.5. ESTRUCTURA GENERAL DE GP61

La estructura de Gp61 presenta un plegamiento general similar al de las lisozimas (algunas putativas) de bajo peso molecular (cerca de 20 kDa), tanto de bacterias como de bacteriófagos, incluyendo la del fago T4 (T4L) (Matthews & Remington, 1974; Strynadka & James, 1996). El dominio más conservado es el de unión a peptidoglicano, identificado como parte de la familia de dominios pfam05838, superfamilia PG_binding_3, en la cual existen 20 secuencias descritas hasta la fecha. La mayoría de ellas son lisozimas de entre 20 y 30 kDa de diversos organismos.

En las dos estructuras más cercanas a Gp61, Lys^{NM} de la familia GH108 y el activador putativo secretado por *P. gingivalis* (Lys^{PG}), se observa una pequeña hoja β de dos láminas que no existe en Gp61. La primera (β_1) ubicada al final de del lazo catalítico, y la segunda (β_2) al inicio del bucle la región variable (figura 5.4).

En el servidor de clasificación estructural de proteínas SCOP (*Structural Classification of Proteins*) (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>), la superfamilia de plegamientos similares a las lisozimas (superfamilia *Lysozyme-like*) posee hasta 11 familias. La familia de proteínas similares a la lisozima del bacteriófago T4 (*T4 lysozyme-like*), ha sido ampliada y renombrada como *Phage lysozyme*. Ésta incluye como modelo, además de la lisozima del bacteriófago T4, a la lisozima del fago P1

(Lyz^{P1}), la cual posee un mecanismo de translocación dependiente de un dominio SAR (Xu *et al.*, 2005). Gp61 estaría incluida en la nueva familia NMB1012-like (Pei & Grishin, 2005), la cual posee como modelos precisamente a las estructuras de Lyz^{NM} (NMB1012, código PDB 2IKB), la lisozima hipotética de *N. meningitidis*, y Lys^{PG}, el activador putativo secretado por *P. gingivalis* (código PDB, 2NR7). Ambas estructuras, Lyz^{NM} y Lys^{PG}, son proteínas con funciones aún putativas, y no poseen dominios SAR o similares. La resolución estructural de Gp61 permite la redefinición o ampliación de esta familia de plegamientos, asociándola a una proteína bioquímicamente caracterizada (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007). Así, la familia de enzimas glicosil hidrolasas GH108 se relacionaría de forma directa a la familia de plegamientos NMB1012-like.

5.6. EL MECANISMO DE TRANSLOCACIÓN DE GP61

Una de las características más relevantes de Gp61, es su particular mecanismo de translocación. La estructura cristalográfica aporta datos fundamentales en este aspecto. El tamaño de la hélice transmembrana (hélice TM) (14 residuos y 20.2 Å de longitud), indica que por sí misma sería incapaz de atravesar por completo la membrana en la conformación inactiva de la enzima. Para ello, serían necesarios entre 20 y 25 aminoácidos, dadas las dimensiones de la membrana (Nyholm *et al.*, 2007). Los ensayos de marcaje con PhoA, realizados por Stojkovic & Rothman-Denes (2007), indican que parte del L₁ también interactúa con la membrana. Mientras tanto, los residuos del 5 al 7 (tres lisinas) muy probablemente interactuarían con las cabezas polares de algunas de las caras de la membrana, algo común en la arquitectura de las hélices transmembranales (Wallin *et al.*, 1998; Nyholm *et al.*, 2007).

Bajo la conformación soluble, parece imposible que la hélice TM pueda interactuar con las cadenas lipídicas de la membrana plasmática. Por tanto, la interacción del dominio de unión a membrana requiere de un cambio estructural significativo, que permita dicha interacción. De esta forma la enzima debe adoptar una conformación que permita la libre interacción del DTM con la membrana, a través de la separación de la hélice TM del núcleo de la enzima. La adopción de esta conformación, requiere la ruptura de las interacciones hidrofóbicas que establece dicho dominio con la región variable y el dominio PG (figura 4.39).

La interacción con la membrana, debe incluir además interacciones con las cabezas polares de los lípidos de la misma (Nyholm *et al.*, 2007). Las lisinas 5, 6 y 7, podrían formar interacciones polares que fortalezcan el anclaje de la enzima. Pero es necesario establecer, a través de ensayos bioquímicos, si estas lisinas interactúan con la región *cis* o *trans* de la membrana, para determinar si finalmente el dominio DTM atraviesa o no la membrana plasmática. No obstante, tomando en cuenta los resultados que indican la presencia del Glu26 en la región *trans* de la membrana interna (hacia el periplasma) (Rothman-Denes, comunicación personal), y la longitud total de la hélice TM, es muy probable que el dominio DTM no atravesase por completo la membrana. De esta forma, una hipótesis razonable es que la hélice se inserte horizontalmente en la región hidrofóbica de la membrana, orientando sus residuos más voluminosos (y por ende más hidrofóbicos) al interior. Mientras que los residuos básicos (las lisinas 5-7) del N-terminal, interactuarían con la cara *trans* de la membrana, al igual que los residuos restantes del dominio DTM a partir del E26 (²⁶EGGYVN³¹) (figura 5.4).

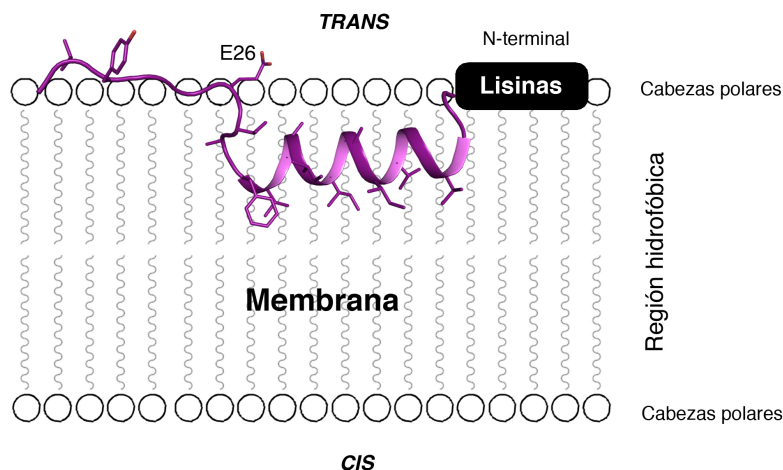


Figura 5.4. Hipótesis de interacción del dominio DTM con la membrana plasmática, en caso de no atravesarla por completo. El dominio DTM (estructura en magenta con cadenas laterales representadas por barras) se insertaría de forma horizontal en la membrana plasmática. De esta forma el ácido catalítico quedaría expuesto y las lisinas del N-terminal podrían interactuar con las cabezas polares de la membrana plasmática.

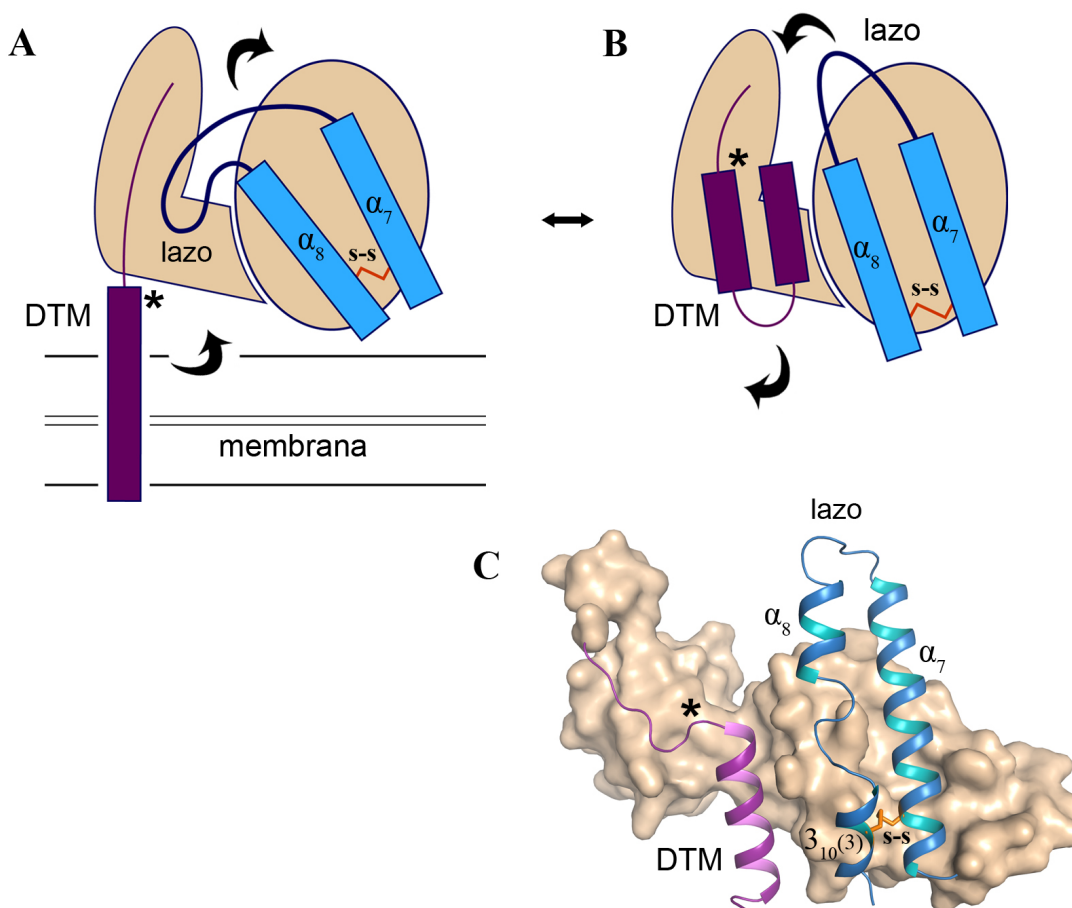


Figura 5.5. Esquema del mecanismo de activación de R^{21} y comparación con la estructura de Gp61. (A) Esquema de la estructura inactiva de R^{21} . (B) Esquema de la estructura activa de R^{21} . (C) Monómero de Gp61 indicando los motivos estructurales análogos a los implicados en el mecanismo de activación de R^{21} . El lazo entre las hélices α_7 y α_8 , juega un papel importante en la activación de R^{21} , liberando el espacio que posteriormente es ocupado por el dominio DTM en la conformación soluble. En el paso inverso (inactivación), este lazo, gracias al movimiento de la α_8 , ocupa el espacio liberado por el dominio DTM, el cual se introduce en la membrana. El asterisco muestra la posición del Glu catalítico en todas las estructuras. Las líneas quebradas naranjas, indican la posición del enlace disulfuro.

La región altamente variable de Gp61 (residuos 46-94) (figura 4.33), tiene un papel importante en la estabilización del dominio DTM en la conformación soluble de la enzima (figura 4.38). Los ensayos de mutación sitio-dirigida sobre la Gly87 (G87P), ubicada entre las hélices α_3 y $3_{10}(1)$, reduce considerablemente la actividad bactericida de la enzima (Rothman-Denes, comunicación personal). Esta glicina coincide estructuralmente con la región que funciona como bisagra molecular en el movimiento de activación de Lys^{P1} (figura 5.5) (Xu *et al.*, 2005). Por tanto, es probable que la separación de la hélice TM desde su posición en la conformación soluble, incluya además un movimiento complejo que exija una reestructuración del ángulo formado entre las hélices α_3 y $3_{10}(1)$, a modo de bisagra entre la región variable y el dominio PG (figura 5.5).

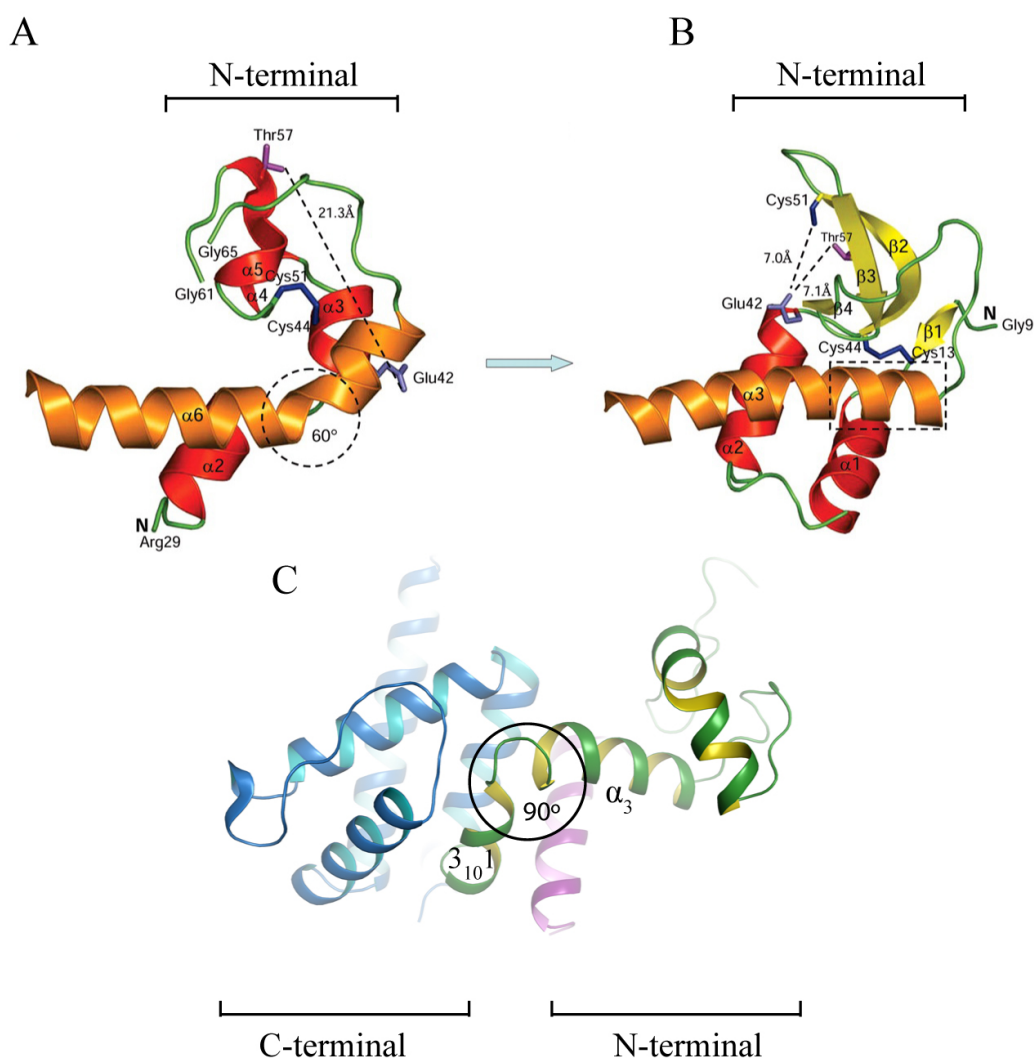


Figura 5.6. Ubicación de la “bisagra” molecular en el mecanismo de activación/translocación de Lys^{P1} y comparación estructural con Gp61. (A) Conformación de la bisagra molecular en el estado inactivo de Lys^{P1}. La bisagra se encuentra en la hélice α_6 de Lys^{P1} (círculo de línea discontinua) y presenta una curvatura con un ángulo de aproximadamente 60°. (B) Conformación de la bisagra molecular en el estado activo de Lys^{P1}. En el estado activo los cambios estructurales provocan una reestructuración de la estructura secundaria de Lys^{P1}. La bisagra molecular ubicada en la ahora denominada α_3 (α_6 en el estado inactivo) pierde la curvatura de 60° que presentaba en el estado inactivo (cuadro de línea discontinua). (C) Posición estructural de la posible bisagra molecular en Gp61. Ésta se ubica estructuralmente en una región homóloga a la de Lys^{P1} y presenta un ángulo aproximado de 90°. La presencia de la Gly87 en la intersección entre ambas hélices (α_3 y $3_{10}(1)$), flexibiliza a esta región. A y B, han sido tomadas y modificadas de Xu *et al.*, (2005).

La similitud estructural de Gp61 es mayor con Lys^{NM}, sin embargo desde el punto de vista funcional, el mecanismo de translocación debe ser muy similar al observado en R²¹ y en última instancia es probable que conserve alguna característica del mecanismo de Lys^{P1}. Estas dos enzimas, a diferencia de Lys^{NM} y Lys^{PG}, poseen dominios SAR que interactúan con la membrana y regulan su actividad (Xu *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009). Por tanto, representan las bases estructurales para el análisis del sistema de translocación de Gp61, aunque tomando en cuenta las diferencias que evidentemente existen entre ellas. Sin la presencia de un dominio SAR (o similar), Lys^{NM} comparte con Gp61 únicamente el mecanismo catalítico. Además la función que cumple Lys^{NM} en *N. meningitidis* es aún desconocida. La comprensión de la función de esta enzima, aportaría información importante para entender el mecanismo de Gp61, al no poseer un dominio transmembrana y tener una homología estructural alta.

Gp61 conserva un puente disulfuro que en R²¹ ancla las últimas dos hélices (α_7 y α_8), y está implicado en mantener la conformación del dominio C-terminal (dominio de unión al PG) (Sun *et al.*, 2009). Durante el proceso de activación de R²¹, este puente permite mantener la integridad de la estructura, mientras que la hélice α_8 se desplaza aproximadamente 30°, y el lazo entre las hélices α_7 y α_8 sufre una reestructuración importante (figura 5.5 A y B). Parte de este lazo cubre, en la conformación inactiva de R²¹, el espacio dejado en el núcleo de la enzima por el desplazamiento de las hélices transmembrana (Sun *et al.*, 2009) (figura 5.5 B). En el caso de Gp61, este puente ancla las hélices 3₁₀(3) y α_7 , y podría funcionar de igual forma, ya que permitiría un movimiento similar, que en este caso involucraría a la hélice α_8 y los lazos que la rodean (α_7 - α_8 y α_8 -3₁₀(3)) (figura 5.5 C). Sin embargo, la estructura cuaternaria de la conformación soluble de Gp61 (tema que será ampliado en la sección 5.8), implica precisamente a esta zona para la dimerización (figura 4.46), y ello plantea varias interrogantes. Así, el dímero podría limitar el movimiento de la hélice α_8 y los lazos α_7 - α_8 y α_8 -3₁₀(3). Por esta razón, no se puede descartar la posibilidad de que Gp61 comparta algunas bases del mecanismo de activación de Lys^{P1}, como la presencia de una región que funcione como “bisagra” molecular (figura 5.6).

5.7. GP61: UN MECANISMO CATALÍTICO COMPLEJO

Las distancias entre los residuos de la posible tríada catalítica de Gp61 (figura 4.41), son superiores a la de la mayoría de las lisozimas de bacteriófagos, especialmente aquellas con dominios SAR (Xu *et al.*, 2005; Mooers *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009). A pesar de que estas distancias tan largas parecen mantenerse en las estructuras resueltas de la familia de las glicosil hidrolasas GH108 (figura 4.43 C y D), es evidente que la posición del glutámico catalítico E26 es atípica en comparación con cualquier otra estructura relacionada estructural y/o funcionalmente (figura 4.43 A y B) (Xu *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009). Aunque las distancias entre los residuos de la tríada no fuesen un problema para la catálisis, la dirección a la que apunta el grupo carboxilo del E26 (figura 4.44), impediría cualquier interacción conjunta de los tres residuos sobre el sustrato.

La comparación de la disposición de la tríada catalítica entre Gp61 y Lys^{NM}, podría apuntar a la presencia de un mecanismo de activación que requiere de la modificación estructural del lazo L₁, tras la separación de la membrana. A pesar de la gran similitud en secuencia de ambos lazos, existen diferencias importantes entre sus

estructuras. Principalmente se observan diferencias en la posición del ácido catalítico, en la distribución de la estructura secundaria, y en la colocación del lazo respecto del núcleo de la enzima (figuras 4.41, 4.42 C y 4.43). De esta forma, el lazo L_1^{21KB} se encuentra en una conformación apreciablemente más cerrada contra el núcleo de la enzima y, además, la cadena lateral de su glutámico catalítico (E16) se dirige hacia el propio lazo (figura 4.43 y 4.44), a diferencia de lo observado en Gp61.

Para cambiar de conformación y redirigir su cadena lateral a la posición observada en el lazo de Lys^{NM} , el ácido E26 en Gp61, debe romper la interacción que posee con la Gln71 (figura 4.44). La interacción de E26 con un residuo de la región variable (Q71), indica que esta región es importante tanto en el mecanismo de translocación como en la catálisis. En otras lisozimas de diversos bacteriófagos (T4, P21, P22 y P1) se ha observado la interacción del ácido catalítico con una arginina de la hélice análoga/equiparable a α_8 (dominio C-terminal o PG) (Strynadka & James, 1996; Xu *et al.*, 2005; Mooers *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009). La conservación de estas interacciones en la forma soluble de varias lisozimas con dominios SAR, podría indicar la presencia de un mecanismo de regulación, que implica la estabilización del ácido catalítico en la conformación soluble y la posterior ruptura de dicho enlace para liberarlo en la catálisis. La resolución estructural de complejos de Gp61 con los sustratos, podría aclarar la posición del ácido y su entorno (mecanismo químico) en el momento de llevar a cabo la hidrólisis del peptidoglicano.

El lazo catalítico de Lys^{NM} muestra distintas conformaciones entre las moléculas de su unidad asimétrica y un patrón de agitación térmica similar al observado en Gp61. La diferencia posicional de dicho lazo respecto del núcleo de la enzima (figura 4.44), parece involucrar la secuencia EGGY conservada en la familia GH108 (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007). Las glicinas de esta secuencia conforman una posible “bisagra” molecular en la que la tirosina, juega un papel importante en el plegamiento del lazo (figura 4.44). El cambio de conformación podría desencadenar una reestructuración que afecte la conformación del lazo, e incluso la estructura secundaria del mismo. En este sentido, Lys^{NM} posee además de las dos láminas β no detectadas en Gp61, una pequeña hélice que se inicia en el ácido aspártico D25 (que forma parte de su tríada putativa). Por su parte, Gp61 posee en esa región la misma secuencia ($^{25}DPGGE^{29}$), aunque no muestra la misma conformación. Por tanto sería posible que el lazo catalítico de Gp61 pueda adoptar la misma estructura que en Lys^{NM} .

Los ensayos de inmersión de los cristales de Gp61 en presencia de sustratos, destruyeron los cristales sin que se hayan podido medir datos de difracción de estos complejos. Estos resultados podrían estar relacionados con cambios drásticos en el lazo catalítico y la región variable de la enzima, mediados por la interacción con los sustratos.

En resumen, la suma de estas evidencias apunta a una reorganización estructural relacionada también con el sitio activo de la enzima. Este hecho, sumado al mecanismo de translocación/activación, representa un sistema complejo que permite a Gp61, y algunas otras enzimas de la familia GH108, cumplir con su función a través de varios niveles de regulación. Inicialmente la proteína debe adoptar una conformación, en la cual el dominio DTM interactúa con la membrana, y se ancla a ella. Esto, según los estudios bioquímicos (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007), parece depender únicamente de la secuencia y estructura particular del propio dominio DTM. La separación de la membrana, al no estar controlada por las holinas, bien podría depender de alguna otra señal inicial (p.ej., disrupción de la fuerza protón-motriz mediada por otros medios y/o

moléculas), o por el contrario, obedecer a un equilibrio inserción/escisión, como se observó en la ubicación subcelular (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007). La escisión espontánea (proporción soluble del 10-15%), podría depender de la inestabilidad intrínseca (revelada por la estructura) del dominio DTM, el lazo catalítico y la región variable. Por ello, la proteína se mantendría en mayor proporción anclada a la membrana, hasta que se alcance la concentración soluble mínima necesaria para la ruptura crítica de la pared. A partir de este punto de *no retorno*, la completa ruptura celular sería la consecuencia de un efecto sinérgico (efecto dominó), que estimularía al resto de las moléculas de Gp61 inactivas, a solubilizarse como consecuencia de la despolarización de la membrana. Finalmente, el aumento de la concentración de Gp61 activa (soluble) contribuiría a acelerar la ruptura de la pared, y llegar al consecuente colapso final de la membrana y la célula. La consecuencia última, comprende la liberación de los viriones para continuar con el ciclo del bacteriófago.

5.8. LA CONFORMACIÓN SOLUBLE DE GP61 ES UN DÍMERO

Los cristales de Gp61 contienen un dímero cristalográfico en la unidad asimétrica (figura 4.46 A), formado por un número importante de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (figuras 4.46 B y C, y tablas 4.10 y 4.11). El análisis por ultracentrifugación analítica permitió corroborar que la mayor proporción en solución (hasta un 96%), corresponde a una estructura cuaternaria con dimérica.

La familia de las lisozimas, despliegan su actividad enzimática en forma de monómero. De hecho, hasta la caracterización de la glicosil hidrolasa de *Tapes japonica* (TJL) (Goto *et al.*, 2007), no se sabía de ninguna lisozima cuya regulación enzimática dependiese de la estructura cuaternaria. La lisozima de este invertebrado, conforma un dímero a través del sitio activo (mediado por interacciones polares) y por tanto, dicha conformación regula negativamente su actividad. En este bivalvo, el cambio de la estructura cuaternaria (mecanismo de activación) depende de la concentración de sal en el medio, y juega un papel importante tanto en la digestión, como en el primitivo sistema de defensa del invertebrado (Goto *et al.*, 2007). Al parecer, la enzima es almacenada en forma cristalina (dímero inactivo) en el estómago y durante el proceso de alimentación entran, conjuntamente con el alimento (bacterias incluidas), grandes cantidades de sal presentes en el mar (hasta 500 mM) que activan la lisozima al disociar el dímero. Gp61, al formar un dímero estable en solución (con hasta 200 mM de NaCl), podría además interactuar con la pared en esta conformación, lo que la diferencia de TJL y representa otro aspecto distintivo de esta enzima respecto del resto de integrantes de la gran familia de lisozimas. La consecución de complejos con fragmentos de PG, podría aclarar esta posible peculiaridad de Gp61. Sin embargo, no se puede asegurar que el dímero es, en efecto, la conformación activa, lo que mantiene la incertidumbre en cuanto a la regulación general del sistema.

TJL no posee una gran similitud en secuencia con Gp61 (< 20%), aunque mantienen un plegamiento similar. La existencia de un sistema de regulación dependiente de la estructura cuaternaria en la familia de las lisozimas, podría arrojar indicios sobre el significado biológico de la existencia de Gp61 como un dímero en solución. Lys^{NM} también presenta la misma conformación multimérica en la unidad asimétrica de su estructura cristalina, con cuatro moléculas conformando un par de homodímeros. El dímero de Lys^{NM} interactúa de igual forma que Gp61, involucrando a

la misma región y residuos equivalentes. Por tanto, la conformación dimérica puede estar extendida dentro de la familia GH108. Este hecho podría apuntar a que en efecto, esta característica esté implicada en alguna función importante.

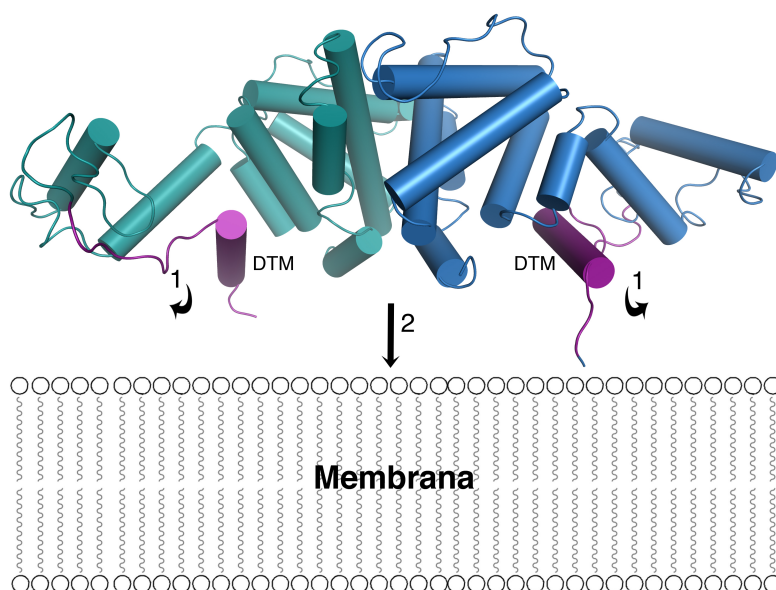


Figura 5.7. Dímero de Gp61 y proceso de inserción a la membrana. En el dímero de Gp61 ambos dominios (DTM) transmembrana (en magenta) se exponen hacia la misma cara. Para poder translocarse a la membrana, los DTM deben inicialmente (1) desplegarse alejándose del núcleo de la enzima y posteriormente (2) insertarse en la membrana plasmática.

De forma interesante las hélices TM de cada uno de los monómeros, se disponen en la misma cara del dímero, lo que podría permitirle unirse a la membrana sin necesidad de disociarse (figura 5.7). La interrelación entre el dímero y la activación (asociación/disociación de la membrana), representan un tema importante que conseguiría aportar información relevante para entender el particular mecanismo de translocación (independiente de holinas) de Gp61. Según los resultados de Stojkovic & Rothman-Denes (2007), la ubicación subcelular de Gp61 difiere de la de Lys^{P1} . Apenas un 10-15% de la actividad de Gp61 fue localizada en periplasma (el resto se ubica en la membrana), a diferencia de la partición igualitaria membrana/periplasma de Lys^{P1} (Xu *et al.*, 2004). No obstante, esta proporción es suficiente para la lisis y liberación de la progenie del bacteriófago N4. Si bien los resultados de mutagénesis (Stojkovic & Rothman-Denes, 2007) demuestran que esta proporción, depende exclusivamente de la secuencia de la hélice TM, no se pueden descartar otras posibilidades que respalden la implicación del dímero sobre la afinidad de la enzima por la membrana, siendo evidente que la unión a la membrana en forma de monómero o dímero, puede influir sobre la afinidad de este mecanismo.

Finalmente, las características particulares de Gp61, permiten presumir unas aplicaciones importantes en varios niveles. Su aplicación directa en terapias clínicas, conjuntamente con moléculas que puedan desestabilizar la membrana externa de bacterias Gram-negativas, podría ser explotada. De hecho en la actualidad, el uso de una terapia clínica que utiliza lisozima y EDTA (para desestabilizar la membrana externa), desarrollada hace 40 años, es cada vez más común en el tratamiento de muchas infecciones causadas por bacterias Gram-negativas (Goldschmidt *et al.*, 1972). Aquí, la capacidad de la enzima para anclarse y escindirse de la membrana externa, puede ser una ventaja que permita una reducción importante en las concentraciones de las

moléculas utilizadas como “adyuvante”. También, la creación de quimeras que permitan sacar provecho del dominio DTM, se perfila como una tecnología prometedora (Manoharadas *et al.*, 2008; Lukacik *et al.*, 2012). El dominio DTM con apenas 31 residuos y la capacidad de por sí sólo determinar una ubicación dual (85/15% membrana/periplasma), supone una ventaja importante en la creación de quimeras para diversos fines. Además, la acción de las proteínas para acabar con las infecciones bacterianas ha demostrado que, además de ser muy efectiva, no representa un problema importante en el desarrollo de inmunogenicidad por parte del hospedador (Loeffler *et al.*, 2001; Jado *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2003; Fischetti, 2003; Fischetti, 2008).

6. CONCLUSIÓN

1. Se ha determinado la estructura cristalográfica, *de novo*, de la AmpD de *C. freundii* a 1.8 Å por medio de la técnica de MAD, aplicada a un derivado de selenio-metionina. También se resolvieron las estructuras de la holoenzima, apoenzima, el complejo con los productos de la reacción, y la holoenzima a pH 5.5. La comparación con la estructura de AmpD previamente resuelta por RMN, mostró diferencias conformacionales importantes, concentradas en cuatro regiones discretas r1, r2, r3 y r4. Estas regiones representan el 30% del total de la enzima y registran desplazamientos de hasta 21 Å, siendo, además, críticas en el reconocimiento y estabilización del sustrato.
2. La AmpD cristalizada es capaz de hidrolizar el compuesto **2** (1,6-anhMurNAc-*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP). Gracias a ello, se determinó la estructura del complejo cristalográfico con los productos de la reacción, **3** (1,6-anhMurNAc) y **4** (*L*-Ala- γ -*D*-Glu-*m*-DAP). Este modelo reveló las bases moleculares del mecanismo catalítico de AmpD, el sitio de unión al azúcar y el sitio de unión al péptido. Se confirmó estructuralmente la participación del Zn^{2+} como catalizador electrofílico de la hidrólisis del muropéptido y también se confirmó al Glu116 como el ácido catalítico.
3. Se desveló la existencia de un mecanismo de activación, en el cual la estructura de RMN representa la conformación inactiva (ⁱAmpD), mientras que el modelo cristalográfico constituye la conformación activa (^aAmpD) de la enzima. La presencia del sustrato no parece ser la responsable de la transición entre ambos estados conformacionales de la enzima. Este mecanismo de activación no tiene precedentes dentro de las amidasas. La magnitud del movimiento estructural desplegado por AmpD en su proceso de activación, representa uno de los cambios conformacionales más extremos para una enzima conformada por un sólo dominio.
4. La simulación por dinámica molecular dirigida, reveló una ruta plausible entre los dos estados conformacionales de AmpD. La enzima puede experimentar una transición entre ambos estados, con un requerimiento energético modesto dada la baja constante de fuerza (por debajo de $0.06 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ Å}^{-1}$) empleada en la dinámica. También, durante la transición se explica el comportamiento de redes electrostáticas importantes en la estabilización de la estructura de AmpD.
5. Se llevaron a cabo experimentos de absorción de rayos X, que permitieron determinar la presencia de hasta tres diferentes estructuras locales de coordinación del metal en función del pH. Estas coordinaciones concuerdan con las encontradas en las estructuras cristalográficas y de RMN.

6. La estructura activa de AmpD y su comparación con la forma inactiva, puede explicar, funcionalmente, la relevancia de varios aminoácidos implicados en mutaciones que afectan la actividad de AmpD, y convierten a estas cepas en altamente resistentes a los β -lactámicos en diversas Enterobacterias. La mayoría de ellas están implicadas: (i) en el proceso de reestructuración necesario para la transición entre la conformación inactiva y activa; (ii) en la conformación de redes de puentes salinos importante para la estabilización de la conformación activa, o (iii) en la interacción con el sustrato en la conformación activa. El modelo activo, también explica y confirma estructuralmente los resultados de las exploraciones bioquímicas previas, relacionadas con residuos implicados en la hidrólisis y coordinación del sustrato, que no habían encontrado correspondencia con la estructura inactiva.
7. Ha sido determinada la estructura cristalográfica, en su conformación soluble, de la glicosil hidrolasa Gp61 del colifago N4 a 2.4 Å de resolución, por medio de la técnica de MAD aplicada a un derivado de selenio-metionina. Esta, es la única enzima de la familia GH108 resuelta estructuralmente, que ha sido también caracterizada bioquímica y funcionalmente.
8. Gp61 posee un dominio de interacción con la membrana compuesto por una hélice anfipática de 20.2 Å, y parte del lazo contiguo (L_1). Un modelo de interacción con la membrana ha sido propuesto, el cual implica la interacción por la región *trans* de la membrana interna, sin necesidad de atravesarla hasta el citosol celular.
9. Se ha definido, por comparación estructural y de secuencia, la posible tríada catalítica de Gp61, la cual cumple con el motivo canónico Glu-8aa-Asp/Cys-5aa-Thr de las lisozimas de muchos bacteriófagos. En la estructura cristalográfica las distancias entre los residuos catalíticos es superior a lo reportado para la superfamilia de plegamientos de las lisozimas. No obstante, estas longitudes se mantienen en proteínas estructuralmente cercanas. La reestructuración del lazo L_1 podría permitir la disposición catalíticamente activa de la enzima.
10. La estructura cuaternaria de Gp61 en su conformación soluble, es un dímero. Hasta ahora no ha sido reportada ninguna enzima de la superfamilia de las lisozimas que hidrolice el sustrato en forma dimérica. Este dímero podría tener repercusiones sobre la afinidad de la enzima por la membrana y, por tanto, sobre el sistema de translocación de la misma. Además esta conformación parece estar extendida dentro de la familia de las glicosil hidrolasas GH108.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abrahams JP & Leslie AGW (1996) Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F₁ ATPase. *Acta Cryst D Biol Crystallogr* **52**, 30-42.

Adams PD *et al.* (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst D Biol Crystallogr* **66**, 213-221.

Aldrich J (1997) R.A. Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922. *Statist Sci* **12**, 162-176.

Altschul SF, Guish W, Miller W, Mayers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

Baley S (1994) The CCP4 suite, programs for protein crystallography. *Acta Cryst D Biol Crystallogr* **50**, 760-763.

Baquero F (1997) Gram-positive resistance: challenge for development of new antibiotics. *J Ant Chem* **39**, 1-6.

Barnickel G, Labischinski H, Bradaczek H & Giesbrecht P (1979) Conformational energy calculation on the peptide part of murein. *Eur J Biochem* **95**, 157-165.

Barnickel G, Nauman D, Bradaczek H, Labischinski H & Giesbrecht P (1983) The target of penicilin (Hakenbeck R, Höltje JV & Labischinski eds.) 61-66, Berlín: W de Gruyter.

Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S & Blanot D (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 168-207.

Benvenuti M & Mangani S (2007) Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. *Nature Protocols* **2**, 1633-1651.

Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2002) Many enzymes are activated by specific proteolytic cleavage. En Biochemistry 5th edition. New York: WH Freeman, cap. 10.5.

Bergfors TM (1999) Protein Crystallization: Techniques, Strategies and tips. International University, La Jolla, CA.

Bernhardt TG, Wang IN, Struck DK & Young, R. (2002). Breaking free: "protein antibiotics" and phage lysis. *Res Microbiol* **153**, 493-501.

Blake CC & Phillips DC (1962) Effects of X-irradiation on single crystals of mioglobina. In biological effects on ionizing radiation at the molecular level (Vienna: International Atomic Energy Agency). 183-191.

Borysowski J, Weber-Dabrowska B & Gorski A (2005) The potential use of

bacteriophages in view of the current antibiotic therapy crisis. *Pol Arch Med Wewn* **113**, 73-78.

Bogaert D, de Groot R & Hermans PWM (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* **4**, 144-154.

Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD & Mengin-Lecreulx D (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 208-233.

Brunger AT, Adams PD, Clore GM, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T & Warren GL (1998) A new software system for macromolecular structure determination. Crystallography & NMR system. *Acta Cryst D Biol Crystallogr* **54**, 905-921.

Brzozowski AM, Derewenda U, Derewenda ZS, Dodson GG, Lawson DM, Turkenburg JP, Bjorkling F, Huge-Jensen B, Patkar SA & Thim L (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**, 491-494

Brzozowski AM & Walton J (2001) Clear strategy screens for macromolecular crystallization. *J Appl Crystallogr* **34**, 97-101.

Bugg TDH, Braddick D, Dowson CG & Roper D (2011) Bacterial Cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends Biotechnol* **29**, 167-172.

Canalias-Reverte F & Valle-Abellán C (2003) Purificación de proteínas. En C Gomez-Moreno & J Sancho. *Estructura de proteínas*. Barcelona: Ariel, cap. 5, p. 117-145.

Carrasco-López C, Rojas-Altuve A, Zhang W, Heseck D, Lee M, Barbe S, André I, Ferrer P, Silva-Martín N, Castro GR, Martínez-Ripoll M, Mobashery S & Hermoso JA (2011) Crystal structures of bacterial peptidoglycan amidase AmpD and an unprecedented activation mechanism. *J Biol Chem* **286**, 31714-31722.

Case DA, Cheatham TE 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM Jr, Onufried A, Simmerling C, Wang B & Woods RJ (2005) The Amber biomolecular simulations programs. *J Comput Chem* **26**, 1668-1688.

Černý V (1985) Thermodynamical approach to the travelling salesman problem: An efficient simulation algorithm. *J Opt Theor Appl* **45**, 41-51.

Chaloupka J & Strnadová M (1972) Turnover of murein in a diaminopimelic acid dependent mutant of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol* **17**, 446-455.

Chang CI, Pili-Floury S, Hervé M, Parquet C, Chelliah Y, Lemaitre B, Mengin-Lecreulx D & Deidenhofer J (2004) A *Drosophila* pattern recognition receptor contains a peptidoglycan docking groove and unusual L,D-carboxypeptidase activity. *PLoS Biol* **2**, E277.

Chang CI, Ihara K, Chelliah Y, Mengin-Lecreulx D, Wakatsuki S & Deidenhofer J (2005) Structure of the ectodomain of *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein

LCa suggests a molecular mechanism for pattern recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 10279-10284.

Chang CI, Chelliah Y, Borek D, Mengin-Lecreulx D, Wakatsuki S & Deidenhofer J (2006) Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pattern-recognition receptor. *Science* **311**, 1761-1764.

Chayen NE (1997) The role of oil in macromolecular crystallization. *Structure* **5**, 1269-1274.

Cheng Q, Nelson D, Zhu S & Fischetti VA (2005) Removal of group B *Streptococci* colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 111-117.

Cheng X, Zhang X, Pflugrath JW & Studier FW (1994) The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4034-4038.

Christianson DW & Cox JD (1999) Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. *Annu Rev Biochem* **68**, 33-37.

Clatworthy AE, Pierson E & Hung DT (2007) Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol* **3**, 541-548.

Collaborative Computational Project number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**, 42-48.

Cottarel G & Wierbowski J (2007) Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends Biotechnol* **25**, 547-554.

Cowie DB & Cohen GN (1957) Biosynthesis by *E. coli* of active proteins containing selenium instead of sulphur. *Biochim Biophys Acta* **26**, 252-261.

Cowtan K (1994) *Joint CCP4 + ESF-EAMCB. Newslett Protein Crystallography*, p. 31, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.

Díaz E, López R & García JL (1990) Chimeric phage-bacterial enzymes: A clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 8125-8129.

Díaz E, López R & García JL (1991) Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J Biol Chem* **266**, 5464-6471.

Donovan DM, Lardeo M & Foster-Frey J (2006) Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiol Lett* **265**, 133-139.

Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, Yang R, Cieplak P, Luo R, Lee T, Caldwell J, Wang J & Kollman P (2003) A point-charge force field for molecular mechanics simulations of protein based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem* **24**, 1999-2012.

- Dundas J**, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y & Liang J (2006) CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucl Acids Res* **34**, 116-118.
- Düring K**, Porsch P, Fladung M & Lörz H (1993) Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J* **3**, 587-598.
- Dwyer DJ**, Kohanski MA, Hayete B & Collins JJ (2007) Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* **3**, 91.
- Emsley P** & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.
- Evans PR** (1993) Proceedings of the CCP4 Study Weekend, editado por L Sayer, N Isaacs & S Bailey, pp 114-123. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Fischetti VA** (2003) Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. *Ann NY Acad Sci* **987**, 207-214.
- Fischetti VA**, Nelson D & Schuch, R (2006) Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum?. *Nat Biotechnol* **12**, 1508-1511.
- Fischetti VA** (2008) Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* **11**, 393-400.
- García JL**, García E, Arraras A, García P, Ronda C & López R (1987) Cloning purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J Virolog* **61**, 2573-2580.
- Sheehan MM**, Garcia JL, Lopez R & Garcia P (1997) The lytic enzyme of pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysine of intergeneric origin. *Mol Microbiol* **25**, 717-725.
- García DL** & Dillard JP (2008) Mutations in *ampG* or *ampD* affect peptidoglycan fragment release from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **190**, 3799-3807.
- Garman EF** & Mitchell (1996) Glycerol concentrations requires for cryoprotection of 50 typical protein crystallization solutions. *J Appl Cryst* **29**, 584-587.
- Génèreux C**, Dehareng D, Devreese B, Beeumen J, Frère JM & Joris B (2004) Mutational analysis of the catalytic centre of the *Citrobacter freundii* AmpD N-acetylmuramyl-L-Alanine amidase. *Biochem J* **377**, 111-120.
- Ghuysen JM**, Dierickx L, Coyette J, Leyh-Bouille M, Guinand M & Campbell JN (1969) An improved technique for the preparation of *Streptomyces* peptidases and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase active on bacterial wall peptidoglycans. *Biochemistry* **8**, 213-22.
- Giacovazzo C** (2011). Fundamentals of Crystallography. Third Edition, Oxford University Press, New York.

Gilliland GL, Tung M, Blakeslee DM & Ladner JE (1994) Biological macromolecule crystallization database, version-3.0 new features, data and the NASA archive for protein crystal-growth data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 408-413.

Glauner B (1988) Separation and quantification of mucopeptides with high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **172**, 451-464.

Goldschmidt MC, Kuhn CR, Perry K & Johnson DE (1972) EDTA and lysozyme lavage in the treatment of *Pseudomonas* and coliform bladder infections. *J Urol* **107**, 969-972.

Gómez J, Gracia-Vázquez E & Ruíz-Gómez J (2008) Significación clínica de las resistencias bacterianas: una perspectiva histórica (1982-2007). *Rev Esp Quimioter* **21**, 115-122.

Goodell EW (1985) Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **163**, 305-310.

Goto T, Abe Y, Kakuta Y, Takeshita K, Imoto T & Ueda T (2007) Crystal structure of *Tapes japonica* lysozyme with substrate analogue: structural basis of the catalytic mechanism and manifestation of its chitinase activity accompanied by quaternary structural change. *J Biol Chem* **282**, 27459-27467.

Grochulski P, Li Y, Schrag JD & Cygler M (1994) Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* **3**, 82-91.

Gründling A, Manson MD & Young R (2001) Holins kill without warning. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 9348-9352.

Guan R, Roychowdhury A, Ember B, Kumar S, Boons GJ & Mariuzza RA (2004) Structural basis for peptidoglycan binding by peptidoglycan recognition proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 17168-17173.

Guan R, Brown PH, Swaminathan CP, Roychowdhury A, Boons GJ & Mariuzza RA (2006) Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein Ia bound to a muramyl pentapeptide from Gram-positive bacteria. *Protein Sci* **15**, 1199-1206.

Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M & Nudler E (2009) Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **325**, 1380-1384.

Haas C, Drenth J & Wilson WW (1999) Relation between the solubility of proteins in aqueous solutions and the second virial coefficient of the solution. *J Phys Chem B* **103**, 2808-2811.

Hanke V, Norelli JL, Aldwinckle HS & Düring K (1998) Transformation of apple cultivars with T4-lysozyme gene to increase fire blight resistance. *Acta Hort* **489**, 253-256.

Harris TJ & Emtage JS (1986) Expression of heterologous genes in *E. coli*. *Microbiol*

Sci **3**, 28-31.

Hendrickson WA (1985) Analysis of protein structure from diffraction measurement at multiple wavelengths. *Trans ACA*. **21**, 11-21.

Hendrickson WA, Horton JR & LeMaster DM (1990) Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a Vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J* **9**, 1665-1672.

Hendrickson WA (1999) Maturation of MAD phasing for the determination of macromolecular structures. *J Synchrotron Rad* **6**, 845-851.

Herbold DR & Glaser L (1975) Interaction of *N*-acetylmuramic acid *L*-alanine amidase with cell wall polymers. *J Biol Chem* **250**, 7231-7238.

Hermoso JA, Monterroso B, Albert A, Galán, B, Ahrazem O, García P, Martínez-Ripoll M, García JL & Menéndez M (2003) Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure* **11**, 1239-1249.

Hermoso JA & Martínez-Ripoll M (2003) Estructura de proteínas por cristalografía de rayos X. En C Gomez-Moreno & J Sancho. *Estructura de proteínas*. Barcelona: Ariel, cap. 10, p. 253-283.

Hermoso JA, García, JL & García P (2007) Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol* **10**, 461-472.

Hesek D, Lee M, Zhang W, Noll BC, & Mobashery S (2009) Total Synthesis of *N*-Acetylglucosamine-1,6-anhydro-*N*-acetylmuramylpentapeptide and Evaluation of Its Turnover by AmpD from *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* **131**, 5187-5193.

Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, Gentz R & Stüber D (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nature Biotechnology* **6**, 1321-1325.

Holm L & Rosenström P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, 545-549.

Höltje JV, Mirelman D, Sharon N & Schwarz U (1975) Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **124**, 1067-1076.

Höltje JV (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *E. coli*. *Arch Microbiol* **164**, 243-254.

Höltje JV, Kopp U, Ursinus A & Wiedemann B (1994) The negative regulator of β -lactamase induction AmpD is an *N*-acetyl-anhydromuramyl-L-amidase. *FEMS Microbiol Lett* **122**, 159-164.

Hooper NM (1994) families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**, 1-6.

Hope H (1988) Cryocrystallography of biological macromolecules: a generally applicable method. *Acta Crystallogr B* **44**, 22-26.

Jacobs C, Huang L-J, Bartowsky E, Normark & Park JT (1994) Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction. *EMBO J* **13**, 4684-4694.

Jacobs C, Joris B, Jamin M, Klarsov K, Van Beeumen J, Mengin-Lecreulx D, van Heijenoort J, Park JT, Normark S & Frère JM (1995) AmpD, essential for both β -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic *N*-acetylmuramyl-*L*-alanine amidase. *Mol Microbiol* **15**, 553-559.

Jacobs C, Frère JM & Normark S (1997) Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* **88**, 823-832.

Jado I (2003) Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* **52**, 967-973.

Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipkind RA, Nordheim A & Stunnenberg HG (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 8972-8976.

Jancarik J & Kim SH (1991) Sparse-matrix sampling a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Crystallogr* **24**, 409-411.

Jones TA, Zon JY, Cowan SW & Kjeldgaard M (1991) Improved methods for model building in electron density maps and location of errors in these models. *Acta Cryst A* **47**, 110-119.

Jovetic S, Zhu Y, Marcone GL, Marinelli F & Tramper J (2010) β -lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense?. *Trends Biotechnol* **28**, 596-604.

Kabsch W (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* **26**, 795-800.

Kaneko K, Okamoto R, Nakano R, Kawakami S & Inoue M (2005) Gene mutations responsible for overexpression of AmpC β -lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol* **43**, 2955-2958.

Kam Z, Shore HB & Feher G (1978) On the crystallization of proteins. *J Mol Biol* **123**, 539-555.

Kerff F, Petrella S, Mercier F, Sauvage E, Herman R, Pennartz A, Zervosen A, Luxen A, Frère JM, Joris B & Charlier P (2010) Specific structural features of the *N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine amidase AmiD from *Escherichia coli* and mechanistic implications for enzymes of this family. *J Mol Biol* **397**, 249-259.

Kim MS, Byun M & Oh BH (2003) Crystal structure of peptidoglycan recognition

protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat Immunol* **4**, 787-793.

Kirkpatrick S, Gelatt CD & Vecchi MP (1983) Optimization by Simulated Annealing. *Science* **220**, 671-680.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA & Collins JJ (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**, 797-810.

Kohanski MA, Dwyer DJ & Collins JJ (2010) How Antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* **8**, 423-435.

Kuntz ID (1971) Hydration of macromolecules IV. Polypeptide conformation in frozen solutions. *J Am Chem Soc* **93**, 516-518.

La Fortelle E de & Bricogne G (1997) Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for the Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods. *Methods Enzymol* **276**, 472-494.

Laskowski RA, McArthur MW, Moss DS & Thornton JM (1993) PROCHECK, a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* **26**, 283-291.

Lebowitz J, Lewis MS & Schuck P (2002) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science* **11**, 2067-2079.

Lee HH & Collins J (2012) Microbial environments cofound antibiotic efficacy. *Nat Chem Biol* **8**, 6-9.

Lee MC & Duan Y (2004) Distinguish proteins decoys by using a scoring function based on a new AMBER force field, short molecular dynamics simulations, and the generalized Born solvent model. *Proteins* **55**, 620-634.

Lee M, Zhang W, Hesek D, Noll BC, Boggess B & Mobashery S (2009) Bacterial AmpD at the Crossroads of Peptidoglycan Recycling and Manifestation of Antibiotic Resistance. *J Am Chem Soc* **131**, 8742-8743.

Leone P, Bischoff V, Kellenberger C, Hetru C, Royet J & Roussel A (2008) Crystal structure of *Drosophila* PGRP-SD suggests binding to DAP-type but not lysine-type peptidoglycan. *Mol Immunol* **45**, 2521-2530.

Leslie AGW (1992) Crystallographic computing 5: From Chemistry to Biology: Oxford University Press.

Liepins E, G  n  reux C, Dahereng D, Joris B & Otting G (2003) NMR structure of *Citrobacter freundii* AmpD, comparison with bacteriophage T7 lysozyme and homology with PGRP domains. *J Mol Biol* **327**, 833-842.

Lindberg F, Lindquist S & Normark S (1987) Inactivation of the *ampD* gene causes semi-constitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* β -lactamase. *J Bacteriol* **169**, 1923-1928.

- Lindquist S**, Lindberg F & Normark S (1989) Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* β -lactamase gene. *J Bacteriol* **171**, 3746-3753.
- Loeffler JM**, Nelson D & Fischetti, VA (2001) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* **294**, 2170-2172.
- Loeffler JM**, Djurkovic S & Fischetti VA (2003) Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* **71**, 6199-6204.
- Loessner MJ** (2005) Bacteriophage endolysins: current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* **8**, 480-487.
- Lukacik P**, Barnard TJ, Keller PW, Chaturvedi KS, Seddiki N, Fairman JW, Noinaj N, Kirby TL, Henderson JP, Steven AC, Hinnebusch BJ & Buchanan SK (2012) Structural engineering of a phage lysine that targets Gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 9857-9862.
- Machin P** (1985) Molecular Replacement, Proceedings of the Daresbury Study Weekend, 15-16. SERC Daresbury Laboratory, Warrington, England.
- Malkin AJ**, Kuznetsov YG, Land TA, DeYoreo JJ & McPherson A (1995) Mechanisms of growth for protein and virus crystals. *Nat Struct Biol* **2**, 956-959.
- Manoharadas S**, Witte A, Bläsi U (2008) Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus*. *J Biotechnol* **139**, 118-123.
- Marcotte EM**, Hart PJ, Boucher I, Brzezinski R & Robertus JD (1993) Crystallization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *J Mol Biol* **232**, 995-996.
- Marcotte EM**, Monzingo AF, Ernst SR, Brzezinski R & Robertus JD (1996) X-ray structure of an anti-fungal chitosanase from *Streptomyces*. N174. *Nat Struct Mol Biol* **3**, 155-162.
- Matthews BW** (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**, 491-497.
- Matthews BW** & Remington SJ (1974) The three dimensional structure of the lysozyme from bacteriophage T4. *Proc Nat Acad Sci USA* **71**, 4178-4182.
- McCall KA**, Huang CC & Fierke CA (2000) Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* **130**, 1437-1446.
- McPherson A** (1989) Preparation and analysis of protein crystals. 2nd Ed. Malabar, Fla.: R.E. Krieger Pub. Co.
- McPherson A**, Malkin AJ, & Kuznetsov YG (1995) The science of macromolecular crystallization. *Struct Lond Engl* **3**, 759-768.
- McPherson A** (2001) A comparison of salts for the crystallization of macromolecules.

Protein Sci **10**, 414-422.

McPherson A (2004) Introduction to protein crystallization. *Methods* **34**, 254-265.

McPherson A & Cudney B (2006) Searching for silver bullets: an alternative strategy for crystallizing macromolecules. *J Struct Biol* **156**, 387-406.

Meroueh SO, Bencze KZ, Hesek D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL & Mobashery S (2006) Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 4404-4409.

Mooers BH & Matthews BW (2006) Extension to 2286 atoms of direct methods in the *ab initio* determination of the unknown structure of bacteriophage P22 lysozyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 165-176.

Morita M, Tanji Y, Orito Y, Mizoguchi K, Soejima A & Unno H (2001) Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin against Gram-negative bacteria. *FEBS Lett* **500**, 56-59.

Mustre de León J, Rehr JJ, Zabisnki SI & Albers RC (1991) *Ab initio* curved-wave X-ray-absorption fine structure. *Phys Rev Condens Matter* **44**, 4146-4156.

Navaza J (1994) AMoRe: an Automated package for Molecular Replacement. *Acta Crystallogr A* **50**, 157-163.

Nelson D, Loomis L & Fischetti VA (2001) Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 4107-4112.

Normark S, Bartowsky E, Erickson J, Jacobs C, Lindberg F, Lindquist, S, Weston-Hafer K & Wikström M (1994) Mechanisms of chromosomal β -lactamase induction in Gram-negative bacteria. In *Bacterial Cell Wall*. New Comprehensive Biochemistry Vol. 27, J.-M. Ghuyssen and R. Hakenbeck, eds. (Amsterdam: Elsevier Science B.V.), pp. 485-503.

Nyholm KM, Özdirekcam S & Killian JA (2007) How protein transmembrane sense the lipid environment. *Biochemistry* **46**, 1458-1465.

Obeso JM, Martínez B, Rodríguez A & García P (2008) Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage Φ H5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *Internat J Food Microbiol* **128**, 212-218.

Panjikar S, Parthasarathy V, Lamzin VS, Weiss MS & Tucker PA (2005) Auto-rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 449-457.

Park JT (1993) Turnover and recycling of the murein sacculus in oligopeptide permease-negative strains of *Escherichia coli*: indirect evidence for an alternative permease system and for a monolayered sacculus. *J Bacteriol* **175**, 7-11.

- Park JT** (1995) Why does *Escherichia coli* recycle its cell wall peptides? *Mol Microbiol* **17**, 421-426.
- Park T**, Struck DK, Dankenbring CA & Young R (2007). The pinholin of lambdoid phage 21: control of lysis by membrane depolarization. *J Bacteriol* **189**, 9135-9139.
- Park JT & Uehara T** (2008) How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 211-227.
- Pape T & Schneider TR** (2004) HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *J Appl Cryst* **37**, 843-844.
- Piazza R** (1999) Interactions in protein solutions near crystallization: A colloid physics approach. *J Cryst Growth* **196**, 415-423.
- Pei J & Grishin NV** (2005) COG3926 and COG5526: A tale of two new lysozyme-like protein families. *Protein Sci* **14**, 2574-2581.
- Pennartz A**, Génereux C, Parquet C, Mengin-Lecreulx D & Joris B (2009) Substrate-Induced inactivation of the *Escherichia coli* AmiD *N*-acetilmuramoyl-*L*-alanine amidase highlights a new strategy to inhibit this class of enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2991-2997.
- Pérez-Dorado I**, Campillo NE, Monterroso B, Hesek D, Lee M, Páez JA, García P, Martínez-Ripoll M, García JL, Mobashery S, Menéndez M & Hermoso JA (2007) Elucidation of the molecular recognition of bacterial cell wall by modular pneumococcal phage endolysin CPL-1. *J Biol Chem* **282**, 24990-24999.
- Perrakis A**, Morris R & Lamzin VS (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement *Nat Struct Biol* **6**, 458-463.
- Petrosino JF**, Pendleton AR, Weiner JH & Rosenberg SM (2002) Chromosomal system for studying AmpC-mediated β -lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1535-1539.
- Ravel B & Newville M** (2005) ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J Synchrotron Radiat* **12**, 637-541.
- Reider A**, Barker SL, Mishra SK, Im YJ, Maldonado-Báez L, Hurley JH, Traub LM & Wendland B (2009) Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *EMBO J*. **28**, 3103-3116.
- Rossmann M** (1972) The Molecular Replacement Method, Gordon and Breach, New York.
- Rubinson KA**, Ladner JE, Tordova M & Gilliland GL (2000) Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 996-1001.

- Rubio V** (2003) La cristalización de proteínas. En C Gomez-Moreno & J Sancho. *Estructura de proteínas*. Barcelona: Ariel, cap. 9, p. 233-252.
- Rupp B** (2010) Biomolecular crystallography. 1st edition, Taylor & Francis Group, New York.
- Russel M**, Linderorth NA & Sali A (1997) Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene* **192**, 23-32.
- Salemme FR** (1972) A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins by X-ray crystallography. *Arch Biochem Biophys* **151**, 533-539.
- Salton MRJ** (1994) The bacterial cell envelope. A historical perspective. En Bacterial cell wall (Ghuysen JM & Hakenbeck R, eds.) 1-22. Elsevier Science Publishing BV, Amsterdam, Holanda.
- Sambrook J** & Russell W (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- São-José C**, Parreira R, Vieira G & Santos MA (2000) The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a *cis*-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. *J Bacteriol* **182**, 5823-5831.
- Sardakis E** & Chayen NE (2000) Improving protein crystal quality by decoupling nucleation and growth in vapor diffusion. *Protein Sci* **9**, 755-757.
- Schneider TR** & Sheldrick GM (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Cryst D* **58**, 1772-1779.
- Schmidtke AJ** & Hanson ND (2006) Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2030-2037.
- Schmidtke AJ** & Hanson ND (2008) Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3922-3927.
- Sheldrick G** & Schneider T (1997) SHELXL: high-resolution refinement. *Methods Enzymol* **277**, 319-343.
- Sheldrick GM** (2002) Macromolecular phasing with SHELXE. *Z Kristallogr* **217**, 644-650.
- Schleifer KH** & Kandler O (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell wall sand their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**, 407-477.
- Schuck P** (2000) Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lanm equation modeling. *Biophysical journal* **78**,

1606-1619.

Slama TG (2008) Gram-negative antibiotics resistance: there is a price to pay. *Critical Care* **12**, doi:10.1186/cc.

Sliz P, Harrison SC & Rosenbaum (2003) How does radiation damage in protein crystals depend on X-ray dose?. *Structure* **11**, 13-19.

Strynadka NC & James MN (1996) Lysozyme: a model enzyme in protein crystallography. *EXS* **75**, 185-222.

Strub MP, Hoh F, Sanchez JF, Strub JM, Böck A, Aumelas A & Dumas C (2003) Selenomethionine and selenocysteine double labeling strategy for crystallographic phasing. *Structure* **11**, 1359-1367.

Stojkovic EA & Rothman-Denes LB (2007) Coliphage N4 N-acetylmuramidase defines a new family of murein hydrolases. *J Mol Biol* **366**, 406-419.

Stryer L, Berg JM & Tymoczko JL (2007) Bioquímica. 6^a ed. Editorial Reverte, Madrid.

Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-234.

Sun Q, Kutty G, Arockiasamy A, Xu M, Young R & Sacchettini J (2009) Regulation of a muralytic enzyme by dynamic membrane topology. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1192-1194.

Terwilliger TC (2000) Maximum-Likelihood density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 965-972.

Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**, 4876-4882.

Tomasz A (1974) The role of autolysins in cell death. *Ann N Y Acad Sci* **235**, 439-447.

Towler P, Staker B, Prasad SG, Menon S, Tang J, Parsons T, Ryan D, Fisher M, Williams D, Dales NA, Patane MA & Pantoliano MW (2004) ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem* **279**, 17996-18007.

Trakhanov S, *et al.* (1998) Cadmium induced crystallization of proteins: II. Crystallization of the *Salmonella typhimurium* histidine binding protein in complex with L-histidine, L-arginine or L-lysine. *Protein Sci* **7**, 600-604.

- Typas A**, Banzhaf M, Gross CA & Vollmer W (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Microbiol Rev* **10**, 123-136.
- Uehara T** & Park JT (2007) An anhydro-*N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase with broad specificity tethered to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 5634-5641.
- Vallee BL** & Galdes A (1984) The metallobiochemistry of zinc enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **56**, 283-430.
- Vallee BL** & Auld DS (1992a) Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes. *Matrix Suppl* **1**, 5-19.
- Vallee BL** & Auld DS (1992b) Functional zinc-binding motifs in enzymes and DNA-binding proteins. *Faraday Discuss Chem Soc* **93**, 47-65.
- van Asselt EJ**, Thunnissen AM & Dijkstra BW (1999) High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *J Mol Biol* **291**, 877-98.
- Voet D** & Voet JG (2008) Bioquímica. 4^a ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Vollmer W** & Bertsche U (2008) Murein peptidoglycan structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1714-1734.
- Vollmer W**, Joris B, Charlier P & Foster S (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 259-286.
- Wallin E** & von Heijne G (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **7**, 1029-1038.
- Walsh CT**, Fisher SI, Park IS, Prahalad M & Wu Z (1996) Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chem Biol* **3**, 21-28.
- Waterhouse AM**, Procter JB, Martin DMA, Clamp M & Barton GJ (2009) Jalview Version 2: a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-1191.
- Weaver LH** & Matthews BW (1985) Structure of bacteriophage T4 lysozyme refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* **193**, 189-199.
- Witte W** (2004) International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Inf Gen Evol* **4**, 187-191.
- Xu M**, Struck DK, Deaton J, Wang IN & Young R (2004) A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 6415-6420.

Xu M, Arulandu A, Struck DK, Swanson S, Sacchettini JC & Young R (2005) Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science* **307**, 113-117.

Young R (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev* **56**, 430-481.

Young R, Wang IN & Roof WD (2000) Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microb* **8**, 120-128.

Zhu G, Chen J, Liu J, Brunzelle JS, Huang B, Wakeham N, Terzyan S, Li X, Rao Z, Li G & Zhang XC (2007) Structure of the APPL1 BAR-PH domain and characterization of its interaction with Rab5. *EMBO J* **26**, 3484-3493.

<http://www.who.int/es>

<http://www.niaid.nih.gov>

<http://www.psi.ch/>

<http://www.embl-hamburg.de/Auto-Rickshaw/>

<http://expasy.org/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/cluastalw2>

<http://www.jalview.org/>

8. ANEXOS

Crystal Structures of Bacterial Peptidoglycan Amidase AmpD and an Unprecedented Activation Mechanism^{*[S]}

Received for publication, May 24, 2011, and in revised form, June 28, 2011 Published, JBC Papers in Press, July 20, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.264366

Cesar Carrasco-López^{‡1}, Alzoray Rojas-Altuve[‡], Weilie Zhang[§], Dusan Hesek[§], Mijoon Lee[§], Sophie Barbe[¶], Isabelle André[¶], Pilar Ferrer^{||**}, Noella Silva-Martin[‡], German R. Castro^{||**}, Martín Martínez-Ripoll[‡], Shahriar Mobashery^{§2}, and Juan A. Hermoso^{‡3}

From the [‡]Departamento de Cristalografía y Biología Estructural, Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain, the [§]Department of Chemistry and Biochemistry, 423 Nieuwland Science Center, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana 46556, the [¶]INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France, CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France, the ^{||}INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Université de Toulouse, F-31400 Toulouse, France, the ^{||}SpLine Spanish CRG beamline at the European Synchrotron Radiation Facility 6 rue Jules Horowitz, F-38043 Grenoble, France, and the ^{**}Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

AmpD is a cytoplasmic peptidoglycan (PG) amidase involved in bacterial cell-wall recycling and in induction of β -lactamase, a key enzyme of β -lactam antibiotic resistance. AmpD belongs to the amidase_2 family that includes zinc-dependent amidases and the peptidoglycan-recognition proteins (PGRPs), highly conserved pattern-recognition molecules of the immune system. Crystal structures of *Citrobacter freundii* AmpD were solved in this study for the apoenzyme, for the holoenzyme at two different pH values, and for the complex with the reaction products, providing insights into the PG recognition and the catalytic process. These structures are significantly different compared with the previously reported NMR structure for the same protein. The NMR structure does not possess an accessible active site and shows the protein in what is proposed herein as an inactive “closed” conformation. The transition of the protein from this inactive conformation to the active “open” conformation, as seen in the x-ray structures, was studied by targeted molecular dynamics simulations, which revealed large conformational rearrangements (as much as 17 Å) in four specific regions representing one-third of the entire protein. It is proposed that the large conformational change that would take the inactive NMR structure to the active x-ray structure represents an unprecedented mechanism for activation of AmpD. Analysis is presented to argue that this activation mechanism might be representative of a regulatory process for other intracellular members of the bacterial amidase_2 family of enzymes.

Bacterial cell wall is comprised of cross-linked strands of peptidoglycan (PG),⁴ which encase the entire cytoplasm. A healthy cell wall is critical for survival of bacteria. During homeostasis, including growth, cell wall is simultaneously biosynthesized and degraded (1). In the course of the normal bacterial growth, more than 50% of the parental peptidoglycan is recycled (1, 2). Whereas the biosynthesis has been studied in greater detail, the degradation of cell wall is less understood, yet it is believed to be quite important. Degradation sets in motion the process of recycling of cell-wall components.

Lytic transglycosylases initiate the degradative events on cell wall (Fig. 1A) in a manner that forms and releases a special disaccharide natural product, compound 1, which is internalized by the function of the integral membrane protein AmpG (3). Once in the cytoplasm, the reaction of NagZ on 1 removes the *N*-acetylglucosamine moiety resulting in compound 2, which then serves as the substrate for AmpD, the second enzyme in the cell-wall recycling pathway. The hydrolytic reaction of AmpD cleaves the peptide from the l-lactyl moiety of 2 resulting in fragments 3 and the peptide 4 (4). The reaction products of NagZ and AmpD play roles in both the entry into the ensuing peptidoglycan recycling events and in an induction event that leads to the expression of β -lactamase, a key β -lactam antibiotic resistance enzyme (5, 6).

AmpD belongs to the amidase_2 family (PF01510) that includes zinc amidases from different pathogenic species (e.g. *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium botulinum* among others) and all of the peptidoglycan-recognition proteins (PGRPs). PGRPs are pattern-recognition proteins that bind and, in certain cases, hydrolyze PG of bacterial cell walls (7–9). PGRPs are found in both invertebrates and vertebrates, but have developed different functions in different animals. Insect PGRPs are involved in the Toll receptor and Imd-signaling pathways that induce expression of antimicrobial peptides (10–12). By contrast, mammalian PGRPs do not act through host signaling pathways, but are bactericidal (11, 13, 14).

^{*} This work was supported, in whole or in part, by the National Institutes of Health. This work was also supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (BFU2008-01711), EU-CP223111 (CARE-PNEUMO, European Union), and the COMBACT program (S-BIO-0260/2006). We acknowledge the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (PI201060E013) and Consejo Superior de Investigaciones Científicas for financial support and for provision of synchrotron radiation facilities.

The atomic coordinates and structure factors (codes 2y28, 2y2d, 2y2c, 2y2b, and 2y2e) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables S1 and S2, Figs. S1–S7, and Movies S1 and S2.

¹ A fellow of the Fundayacucho Foundation (Venezuela).

² To whom correspondence may be addressed: Serrano, 119, 28006 Madrid, Spain. Tel.: 34-915619400; Fax: 34-915642431; E-mail: xjuan@iqfr.csic.es.

³ To whom correspondence may be addressed: 423 Nieuwland Science Center, IN 46556. E-mail: mobashery@nd.edu.

⁴ The abbreviations used are: PG, peptidoglycan; PGRP, peptidoglycan-recognition protein; TMD, Targeted Molecular Dynamics; RMSD, root mean square deviation; XAS, x-ray absorption spectroscopy; EXAFS, extended x-ray absorption fine structure.

The NMR structure of *Citrobacter freundii* AmpD has been reported (15) and its fold together with coordination of the catalytic zinc ion have been described. However, this structure did not provide information about substrate binding or mechanism of hydrolysis. We report herein the first x-ray structure for AmpD, as well as its complex with its reaction products. As is outlined in this report, the x-ray structure(s) represent the active conformer of the enzyme. Indeed, we show that the crystals are catalytically active, resulting in the two products on soaking of substrate **2**. These x-ray structures for AmpD were contrasted with the previously reported NMR structure. The NMR folding does not possess an accessible active site and shows the protein in what we characterize as an inactive “closed” conformation. The transition of the protein from this inactive conformation to the active “open” conformation entails large conformational changes of as much as 17 Å. We believe that the degree of this conformational change is unprecedented for any single-domain protein. We put forward a proposal that this large conformational change represents a novel regulatory mechanism for activation of this metalloprotease, which does not find precedent in the considerable literature of these hydrolytic enzymes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

AmpD Substrates Synthesis—The substrates for AmpD, compounds **1** and **2**, were synthesized according to the literature (16).

AmpD Production and Seleno-methionine Labeling of AmpD in *Escherichia coli*—The AmpD gene was cloned from *C. freundii* and ligated into pET24a(+) vector under the T7 promoter, as described before (4). We used the methionine auxotrophic *E. coli* B834 (DE3) for transformation with the plasmid. Initially cells were grown in minimal medium containing all essential amino acids. After cell growth reached mid-log phase (12–18 h), the cells were spun down, and the pellet was resuspended in the minimal medium (without methionine). The cells were starved by incubating for 8–12 h at 37 °C, before the addition of seleno-L-methionine. The overexpression of AmpD was induced by IPTG (400 μM) to allow incorporation of seleno-L-methionine. The incorporation of seleno-methionine into purified AmpD was confirmed by mass spectrometry.

Preparation of Bacterial Lipid Extract Vesicles—Lipid vesicles were prepared to test the activity of AmpD in their presence. Chloroform in lipid (*E. coli* Lipid Extract, Avanti Polar Lipid, Inc.) stock solutions (25 mg/ml) was removed under a flow of nitrogen and the residue was resuspended in a flow buffer solution (10 mM HEPES, pH 7.4, containing 0.16 M KCl). The solution was then mixed for 5 min and submitted to sonification for 10 min in a Branson 1200 sonifier. After sonification, lipid solutions were passed 17 times through a Liposofast microextruder containing a 400 nm polycarbonate filter. Lipids concentration was 15 mg/ml, the final concentration of total lipids was 1.5 mg/ml in reaction buffer.

Kinetic Studies—The assays were carried out in 20 mM sodium phosphate buffer, 1.0 mM DTT, pH 7.0 or 40 mM bicarbonate buffer, 1.0 mM DTT, pH 7.0, at 25 °C with substrate (anhMurNAc-tripeptide; compound **2**) concentrations ranging from 100 μM to 3.0 mM and AmpD concentrations of 50 nM.

The reaction mixtures were incubated at 25 °C for 30 min in the absent or present of lipids. The reactions were stopped by the addition of 2 volume of 0.1% TFA in water. Reaction products were separated and quantified on a C18 reversed-phase HPLC column (Sunfire C18, 3.5 μm, 4.6 mm × 150 mm; Waters) on a PerkinElmer series 200 System. The column was equilibrated with 0.05% trifluoroacetic acid in water and eluted with a linear acetonitrile gradient from 0 to 15% over 40 min with a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored at 205 nm. The catalytic activity of the AmpD was quantified from the rate of substrate disappearance and of tripeptide appearance.

Crystallization—High-throughput techniques with a NanoDropTM ExtY robot (Innovadyne Technologies Inc.) were carried out to test initial crystallization assays based on commercial Qiagen screenings, JCSG+Suite and PACT Suite. All crystallization nano-trials were performed by sitting-drop vapor-diffusion method at 291 K on InnovaplateTM S.D.-2 microplates (Innovadyne Technologies Inc.) mixing equal amounts (250 nl) of purified AmpD (17 mg/ml in 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.0, supplemented with 1 mM NaN₃) and precipitant solutions. NanoDrop robot drops (500 nl, protein and precipitant solutions) were equilibrated against 65 ml of mother liquor. Good quality crystals of AmpD and AmpD-SeMet grew under conditions containing 0.1 M Tris, pH 6.0, 0.1 M Li₂SO₄ plus 28% PEG 3350, using the sitting drop method (1:1 volume proportion), mixing 1 μl of native AmpD (or 1 μl of AmpD-SeMet) at 8 mg/ml in 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, with 1 μl of precipitant solution and equilibrated against 500 μl of mother liquor. AmpD complexes were prepared using holoenzyme crystals; these crystals were soaked rapidly into mother liquor supplemented with 25% of glycerol and 50 mM compound **2**.

X-ray Data Collection and Structural Determination—AmpD-SeMet crystals were soaked for 5 s in a cryoprotectant solution (20% v/v of glycerol diluted in crystallization mother liquor) prior to flash-cooling at 100 K. X-ray data sets up to 1.7 Å resolution were collected using synchrotron radiation facility at ESRF (Grenoble). Multiple-wavelength anomalous diffraction (MAD) data sets from AmpD-SeMet crystals were collected at 100 K on BM14 beamline using Marmosaic 225 CCD detector (oscillation range 1°, crystal-detector distance set to 169.26 mm). Holoenzyme, apoenzyme, AmpD-complex and AmpD at pH 5.5 data sets were collected at 100 K on ID14-1 (apoenzyme, AmpD-complex), ID29 (holoenzyme) and ID23-2 (AmpD at pH 5.5) beamlines. All data sets were processed using XDS (17) and MOSFLM (18) and scaled using SCALA (19) from CCP4 program suite (20). Data processing results are summarized in Table 1. Auto-Rickshaw (21) MAD procedure was used (three-wavelengths) to phase and build an initial model. Five selenium atom positions were found for the three molecules present in the asymmetric unit. The occupancy of all substructure atoms was refined, and initial phases were calculated using the program MLPHARE (20). Electron density maps were improved using the DM program (22), followed by automatic auto-tracing of three monomers in the asymmetric unit, using program ARP/warp (23). A total of 320 residues (out of 561) were automatically assigned in the asymmetric unit and the remaining residues were modeled manually using the pro-

gram O (24) and COOT (25). Structural model was refined with the PHENIX program (26). The holoenzyme, apoenzyme, the AmpD complex, and AmpD at pH 5.5 were solved by the molecular replacement method with the program MolRep from CCP4 (20), using AmpD-SeMet model as the initial template. Refinement of these structures was carried out with the PHENIX program (26). The final models presented good stereochemistry parameters and R and R_{free} values (Table 1).

Targeted Molecular Dynamics Calculations—The conformational transitions from the closed to the open AmpD conformers were simulated using the Targeted Molecular Dynamics (TMD) method implemented in AMBER 9 suite of programs. The models of AmpD were derived from the corresponding coordinates of the closed NMR structure (PDB accession code: 1J3G) and the high-resolution crystal structure of AmpD in its open conformation. Hydrogen atoms were added on histidine side chains based on protonation scheme derived from NMR analysis. Histidines 34, 61, 75, and 96 and 154 were only protonated at Ne whereas charged histidines 18 and 69 were protonated at both nitrogens, N δ and Ne. The all-atom ff03 force field (27, 28), with the Generalized Born/Surface Area solvation model was used in TMD simulations (29). Preparation of simulations consisted of 6 initial energy minimization cycles (200 steps of steepest descent followed by 500 steps of conjugate gradient methods), where atomic positions of the protein backbone were restrained using a harmonic potential. The force constant was progressively diminished along the energy-minimization procedure from 20 to 1 kcal mol⁻¹ Å⁻². A slow heating to 303 K over a period of 20 ps followed the energy minimizations, while restraining backbone atoms using a harmonic potential of 10 kcal mol⁻¹ Å⁻². At the final required temperature, the system was equilibrated for 80 ps, while progressively decreasing the harmonic restraints on backbone atoms from 10 to 1 kcal mol⁻¹ Å⁻². Finally, an unrestrained equilibration was performed over 20 ps. Langevin dynamics were used to maintain the temperature at 303 K. Long-range electrostatic forces were handled by the particle-mesh Ewald method. The time step of the simulations was 2.0 fs, and the SHAKE algorithm was used to constrain the lengths of all chemical bonds involving hydrogen atoms to their equilibrium values.

The TMD method allows observing large scale conformational transitions between two known end point conformations of a protein, which are presently beyond the reach of atomistic MD simulations. This is accomplished by an additional steering force based on a mass-weighted RMSD with respect to reference target conformation that is applied in the force field as an extra harmonic potential energy term of the form in Equation 1,

$$E = 0.5 \text{ kr} \times N \times (\text{RMSD}(t) - \text{taRMSD}(t))^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

where E is the biasing potential energy in kcal/mol during the TMD simulation, kr is the force constant, N is the number of atoms, $\text{RMSD}(t)$ is the root mean square deviation of the simulation structure at time t relative to the target structure and $\text{taRMSD}(t)$ is the target RMSD value at time t . The conformational transition from the initial geometry to the final target geometry is driven by decreasing the value of the $\text{tRMSD}(t)$ to 0

as a function of the simulation time. A force constant of 0.04–0.06 kcal mol⁻¹ Å⁻² applied on heavy atoms of the protein over 1 ns appeared sufficient to find a path for the transition.

The resulting trajectories were analyzed using the Ptraj module of the AMBER package (30). The RMSD was calculated for the protein backbone atoms using least squares fitting. Distances between given residues were calculated with respect to their center of mass.

X-ray Absorption Spectroscopy—X-ray absorption spectroscopy (XAS) measurements were performed at the Spanish CRG beamline (SpLine-BM25-A) at the ESRF (31). XAS spectra recorded at Zn K-edge on AmpD protein were measured under several experimental conditions: crystalline protein suspended in pH 6 solution and AmpD solutions at pH 5.6, 7, and 8.2. The samples were placed on quartz capillary and/or a Teflon special cell sealed by Kapton film depending on the solution concentration and quantity. The XAS spectra have been recorded at room temperature. Several scans for each sample were carried out to check the sample stability along the time and to improve the signal-to-noise ratio. The incoming beam was monitored by a N₂-filled ionization chamber. Data were collected in the fluorescence yield mode with a 13-element Si(Li) energy dispersive detector (from e2v Instruments). XAS data for crystalline protein suspended on pH 6 solution were measured up to $k = 15$ and for AmpD solutions at different pH values up to $k = 12$. Zn-KA fluorescence line was recorded with the detector placed parallel to the x-ray electric polarization field (*i.e.* forming 90° from the incoming x-ray beam). Data treatment was with ATHENA software and EXAFS analysis was performed with ARTEMIS fitting software (32). The Fourier transforms were obtained from the EXAFS signal using a Hanning window between 2.5–10, 2.6–7.8, 2.6–8.8, and 2.4–8.4 Å⁻¹ for crystalline and liquid solutions at 5.6, 7, and 8.2 pH, respectively. The filtered EXAFS signals, resulting from Fourier transformation from the experimental signal, were obtained using a Hanning window between 1.0 and 3.3 Å. Scattering amplitudes and phase functions of the coordination spheres were calculated from AmpD x-ray crystal structure, with the FEFF6 code (33).

RESULTS AND DISCUSSION

Overview of the Crystal Structure of AmpD—Crystal structure of AmpD was solved by MAD technique with a Se-Met derivative, as molecular replacement failed when NMR structure was used as initial model. High-resolution crystal structures for a Se-Met derivative of AmpD, the holoenzyme, the apoenzyme, and the complex with the reaction products have been solved in this report (Table 1). Superimposition of all these structures yields an average root mean square deviation (RMSD) value of 0.14 Å. The crystal structure of AmpD presents a fold related to that of PGRPs and T7 lysozyme, and comprises three β -sheets, four α -helices and four 3-helical turns (Fig. 1B). Superimposition with the previously reported NMR structure for the same enzyme (15) revealed a very high RMSD value of 3.9 Å for all (181) C α atoms. The highest observed deviations (4 to 17 Å) are concentrated in four specific regions of the protein (r1, residues 17–26; r2, residues 38–71; r3, residues 120–124 and r4, residues 158–165), representing one-third of the entire protein (Fig. 2 and supplemental Movie S1).

TABLE 1

Data collection and refinement statistics

Parameters	AmpD-SeMet			Holoenzyme	Apoenzyme	AmpD-complex	AmpD-pH 5.5
Data collection							
Space group	P3 ₂			P3 ₂	P3 ₂	P3 ₂	P3 ₂
Cell dimensions							
<i>a</i> , <i>c</i> (Å)	67.7, 92.7			67.7, 92.8	68.08, 93.08	67.7, 92.8	67.98, 93.12
α , β , γ (°)	90, 90, 120			90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120
<i>T</i> (K)	100			100	100	100	100
	<i>Peak</i>	<i>Inflection</i>	<i>Remote</i>				
Wavelength (Å)	0.97856	0.978910	0.918400	0.97625	0.93340	0.97627	0.872600
Resolution (Å)	1.8	1.85	1.7	2.0	1.8	1.9	2.0
No. unique reflections	42215	39677	52405	32155	44523	31507	32782
<i>R</i> _{merge} (%)	8.9 (49.4) ^a	10.1 (55.6)	10 (72.6)	11.0 (48.2)	12.9 (55.7)	7.2 (17.8)	9.4 (26.5)
<i>I</i> / <i>s(I)</i>	15.9 (3.0)	11.5 (2.1)	12.4 (2.2)	23.4 (5.6)	13.7 (1.9)	13.8 (4.8)	12.9 (4.9)
Completeness (%)	95.8 (76.8)	97.7 (85.6)	100 (100)	100 (100)	99.8 (99.8)	94.4 (76.5)	100 (100)
Redundancy	7.9 (5.4)	5.6 (4.1)	5.8 (5.7)	11.4 (11.2)	5.7 (5.4)	4.4 (2.4)	4.2 (4.2)
Refinement							
Resolution (Å)	58.6–1.8			35.8–2.0	36.4–1.8	58.7–1.9	46.6–2.0
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.18/0.23			0.20/0.27	0.19/0.25	0.17/0.22	0.21/0.27
No. atoms							
Protein	4237			4224	4199	4310	4234
Water	689			863	682	556	827
Ligand						46	
Metal ions (Zn)	3			3	-	3	3
Selenium	6			-	-	-	-
<i>B</i> -factor (Å ²)							
Protein	16.89			17.16	16.32	15.11	12.03
Ligands	-			-	-	32.29	-
Water	24.09			20.65	24.88	23.70	18.18
R.m.s. deviations							
Bond length (Å)	0.010			0.011	0.007	0.014	0.011
Bond angles (°)	1.116			1.195	1.049	1.121	1.115
Ramachandran favoured/outliers (%)	98.0/0.0			98.2/0.0	98.6/0.17	97.8/0.19	97.2/0.21
Total number of residues in the AU	537			537	532	541	538
PDB code	2y28			2y2d	2y2c	2y2b	2y2e

^a Value for the highest resolution shell is shown in parenthesis.

These four regions surround the catalytic zinc ion (Fig. 2C). To our knowledge, this structural mobility represents one of the largest, if not the largest, ever reported for a single-domain protein. Utilizing the Dali server (34), the closest structural models of the crystal structure of AmpD are the periplasmic PG amidase AmiD (Z score 17.8, RMSD of 1.9 Å for 135 C α atoms), the endolysin from *Bacillus subtilis* (Z score 15.5, RMSD of 2.5 Å for 141 C α atoms), the lambda prophage Ba02 endolysin (PlyL) encoded by the *Bacillus anthracis* genome (Z score 15.1, RMSD of 2.6 Å for 143 C α atoms) and all the PGRPs from different species, such as PGRP-LE or PGRP-SA from *Drosophila melanogaster* (Z score 14.5, RMSD of 2.4 Å for 138 C α atoms) or Human PGRP-I α (Z score 14.4, RMSD of 2.3 Å for 135 C α atoms). The NMR structure of AmpD appears at the end of the list at position 108 (Z score 13.2, RMSD of 3.5 Å for 159 C α atoms).

Characteristics of the PG Binding Cleft—The crystals of AmpD turned over the synthetic substrate on soaking (Fig. 3, A and C). There exists a cavity in AmpD (the glycan-binding site) in which the 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramyl moiety is accommodated (Fig. 3A). This cavity is connected to a long groove in which the peptide stem is ensconced (the peptide-binding site). The PG-binding site of AmpD, whose general topography is maintained in other PGRPs (35–38), resides in a long cleft whose surface is formed by helix α 2 and four loops (β 3– β 10(1), β 4– α 1, α 2– β 5, β 10(4)– α 4 and β 6– β 7) that project above the central β -sheet platform (Fig. 1B). The groove is ~26 Å long, with a narrow region near the active site (~9 Å wide) and broader portions at the ends (~12 Å wide at the glycan-binding site and ~16 Å wide at the end of the peptide-binding site). The main

differences between PG-binding cleft in AmpD and PGRPs are the entire r2 region (presenting α 1 and α 2 helices) that is completely different than that observed in PGRPs (in fact this region is strongly stabilized in PGRPs through highly conserved disulfide bridges) and, to a less extent, the r1 region and the 97–107 loop (Fig. 4).

PG Recognition in AmpD—The complex of the 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramyl moiety in the active site is stabilized by hydrophobic residues (Fig. 3C), constituting the surface of the glycan-binding site. The lactate carboxylate, formed on catalysis within the crystal, is coordinated to the zinc ion, replacing the metal-coordinated water molecule seen in the structure of the native enzyme (supplemental Fig. S1). Three residues (Asn-35, Lys-162, and Tyr-63) are critical in orientation of the 1,6-anhydro-*N*-acetylmuramyl moiety through hydrogen bonds. These interactions are in agreement with reported mutagenesis results indicating that modification of Tyr-63 or Lys-162 resulted in strong attenuation of the AmpD activity (39). The peptide is mainly stabilized by three salt-bridge interactions, while hydrophobic residues (especially Trp-95) build a surface on which the backbone of the peptide stem is accommodated. In addition, hydrogen-bonding interactions are also observed (Fig. 3C). Interestingly Arg-71 interacts with diaminopimelate (DAP) moiety (Fig. 3C); the presence of an Arg or Asp residue at this position has been reported as critical for DAP or Lys specificity at the third position of the stem peptide in PGRP-SD (40) and PGRP-SA (41), respectively. The three-dimensional structure of AmiD, a periplasmic enzyme of the same amidase₂ family (PF01510), has very recently been described in complex with its substrate (42). Whereas in both AmiD and AmpD a

Activation Mechanism of Peptidoglycan Amidase AmpD

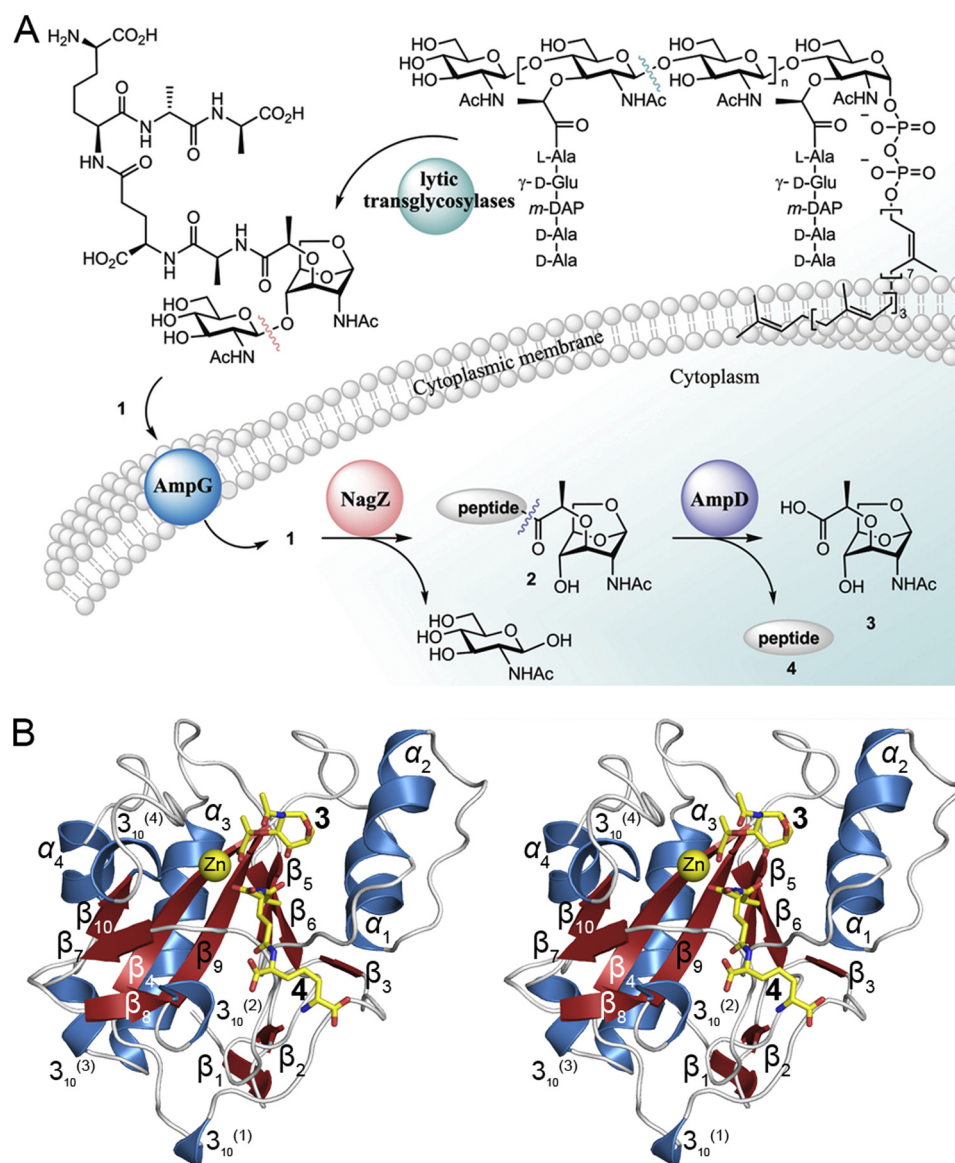


FIGURE 1. Cell wall recycling and AmpD crystal structure. *A*, schematic of the early events of cell wall recycling. *B*, stereo view showing three-dimensional structure of AmpD in complex with the reaction products 3 and 4. Secondary structure elements are labeled.

similar structure and protein-ligand interaction pattern are observed for the r4 and the r1 regions; r2 and r3 regions are absent in AmiD (supplemental Fig. S2).

Structural Rearrangements upon Activation—Superimposition of our AmpD in complex with reaction products onto the NMR structure reveals that the latter could not accommodate ligand binding, as the “closed” structure lacks space for both the glycan and peptide moieties of the substrate (Fig. 3, *A* and *B*). In fact, critical residues for binding to the substrate such as Arg-161 and Lys-162, as seen in the x-ray complex, are more than 20 Å away from their corresponding positions in the NMR structure (Fig. 3, *A* and *B*). The foregoing discussion reveals that the NMR structure simply lacks an active site predisposed to binding of the substrate. Hence, the obvious conclusion is that the conformer of AmpD as seen in the NMR structure is that of an inactive enzyme (ⁱAmpD), whereas the x-ray structure is the active conformer (^aAmpD). The change of conformation from the ⁱAmpD to ^aAmpD involves large structural rearrangements

(in both backbone and side chains), resulting in a significant reorganization of the secondary structural elements in the protein (Fig. 3*D*) and in modification of the intramolecular interaction network. These structural rearrangements intimately entail the regions r2–r4, which are virtually unconnected through space to each other in ⁱAmpD, but converge to come in close contact with one another in the structure of ^aAmpD (Fig. 3, *A* and *B*). This process can best be characterized as an enzyme-activation event. Distinct changes are also observed in the coordination of the catalytic zinc ion (supplemental Fig. S1). We add that the presence of zinc cation is not required to maintain the overall conformation of the enzyme, as the same was observed in both the holo and apoenzyme structures.

The largest changes are observed in the r2 region (an average of 7 Å for 33 Cα atoms) that starts with the ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ loop. This region is unique among all the three-dimensional structures of amidase_2 family members reported to date. The nature of the amino acid composition of this loop presents

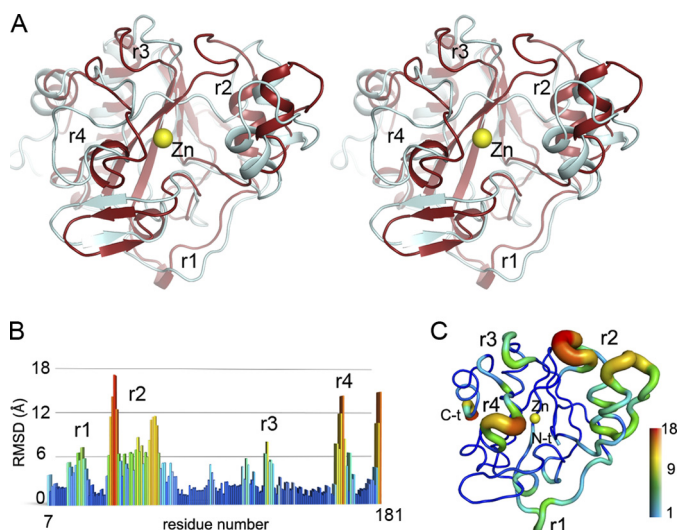


FIGURE 2. Structural differences between NMR and x-ray structures. A, stereo view of the superimposition of the NMR structure (PDB code 1J3G) in cyan and the x-ray structure (this report) in red. B, root-mean square deviations along the sequence between the NMR structure and the x-ray structure. RMSD values are represented in colors ranging from blue (lower RMSD values) to red (higher RMSD values). Regions r1–r4 showing the highest structural deviations (4–17 Å) are labeled. The C-terminal tail presenting also large RMSD values was not considered due to the high variability exhibited among the 20 conformers of the NMR PDB file. C, tube representation of AmpD showing the largest structural rearrangements between the NMR and x-ray structures. Rearrangements in the backbone of the polypeptide chain are indicated by colors (as in panel C) and also by the thickness of the Cα chain that augments with increasing RMSD.

important clues to the structural rearrangement; Gly residues provide flexibility to the stretch of amino acids, and the first two residues (Pro-39, Pro-40) change their amide configurations from *cis* to *trans*, and *trans* to *cis*, respectively, in transition from the inactive to the active states, reminiscent of what is seen during interfacial activation of lipases (43, 44). Furthermore, Glu42 is pivotal in the structure of ⁱAmpD by making a strong salt-bridge interaction network with an exposed basic patch of positively charged residues (Arg-12, Arg-13, Arg-79, and Arg-80). Interestingly this network is broken in ^aAmpD (Fig. 5).

The AmpD enzymes from different bacteria are highly homologous and their structures must be very similar to that of the *C. freundii* AmpD. Therefore, point mutations that inactivate the AmpD from one bacterial species are probably also deleterious in *C. freundii* AmpD. A compilation of inactivation mutations from nine enterobacteria identified 19 residues as sites of inactivating point mutations capable of triggering constitutive β -lactamase expression (45). As reported in the discussion of the NMR structure of AmpD (15), most of these mutations were not located at the active site and therefore the structural explanation of their relevance was rather difficult to assign at the time. However, our structural comparison of ⁱAmpD and ^aAmpD can now explain the relevance of all of these amino acids (supplemental Table S1). In fact, most of these mutations are indeed blocking (i) the structural arrangement required to transition from the inactive to the active conformation, (ii) the salt-bridge interaction network or (iii) the interaction with the substrate in the active conformation (supplemental Table S1). Such inactivating point mutations blocking

structural rearrangement required for AmpD activation, further support the existence of both inactive and active states in AmpD.

Conformational Transition between the Inactive and Active States—The conformational transition between the inactive and active states was explored by Targeted Molecular Dynamics (TMD) simulation, which revealed a plausible route to transformation from one conformational state to the other (supplemental Fig. S3 and Movies S2A and S2B). Within the first 0.5 ns, drastic local rearrangements of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ helices from the r2 region are observed, accompanied by conformational changes within the r4 region, corresponding to the loop comprised of $\beta 10$ and $\alpha 4$ helix. The hinge motion of r2 region involves a rapid swing of both $\alpha 1$ and $\alpha 2$ helices, which then induce conformational rearrangements of the adjacent ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ loop, in particular a sliding displacement of the hydrophobic Phe-43 that becomes more exposed to the solvent (0.5 ns). Phe-43 appears to play a key role during the conformational transition (~ 1 ns) by pulling away Glu-42 out of the tight Arg12–Glu42–Arg79 salt-bridge network. As shown by the sharp increase in distances Glu42...Arg79 and Glu42...Arg12 (Fig. 5), the Glu-42 side chain is displaced rapidly (around 1.0 ns of the simulation) toward its crystallographic position after breaking first the ionic interaction with Arg-12 guanidinium, then dissociating from Arg-79 side chain, while transiently interacting with Arg-80. All together these data provide structural context into how AmpD can experience conformational change between the two states, with a likely modest energy barrier, given the low force constant (lower than $0.06 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) required to drive the conformation transition in TMD.

Effect of pH on AmpD Structure—The presence of the substrate seems not to be responsible for AmpD activation as we obtained the same three-dimensional structure for the enzyme by itself and in complex with its substrate/products. A difference between the conditions for the two structural determinations (NMR and x-ray) was pH. To see the effect of pH on crystal structure, first, AmpD crystals obtained at pH 6.0 were soaked in buffer at pH 5.5 (that of NMR determination) without any observable effect on crystal quality. Second, we succeeded in growing AmpD crystals at pH 5.5. The AmpD structure at pH 5.5 presented intriguing differences compared with that at pH 6.0 (RMSD. of 0.36 \AA for all Cα atoms), all concentrated in the regions involved in activation (supplemental Fig. S4). In addition, the Zn coordination was more similar to that observed in the NMR structure (supplemental Fig. S1). To further explore pH effect on AmpD, we performed extended x-ray absorption fine structure (EXAFS) spectroscopy experiments at different pH values (see “Experimental Procedures”). X-ray absorption spectroscopy (XAS) provides information about the electronic and geometrical structure around the absorbing atom. XAS experiments were performed at different pH values (5.6, 6.0, 7.0, and 8.2) in order to analyze their changes in Zn coordination. In supplemental Table S2, the structural parameters obtained for atoms around Zn are shown. XAS results indicate the existence of three different zinc local structures as a function of the pH of the media. The structure at 7.0 and 8.2 are similar, while the Zn coordination at pH 6.0 is in agreement

Activation Mechanism of Peptidoglycan Amidase AmpD

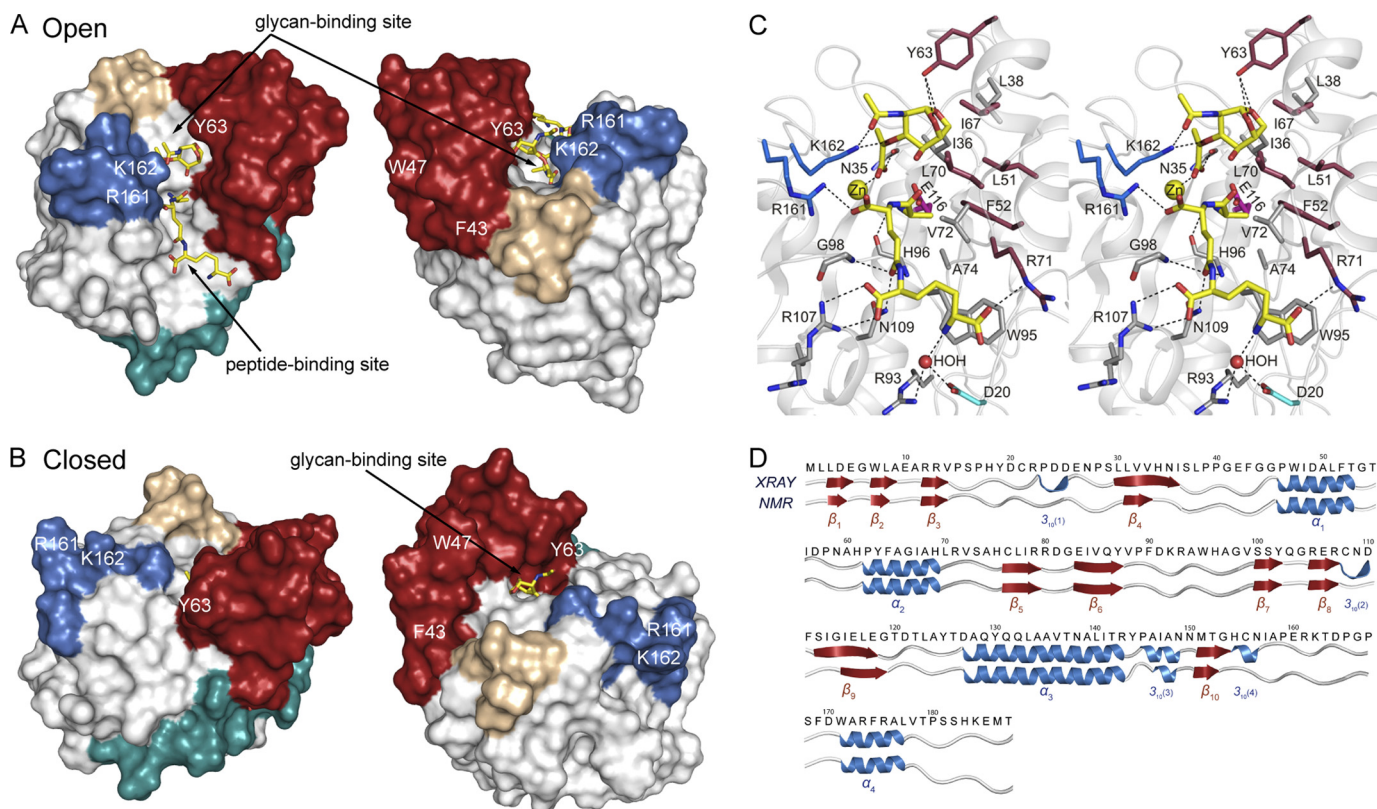


FIGURE 3. Structural rearrangements upon AmpD activation. **A**, molecular surface representation of ³AmpD in complex with the reaction products of compound 2 (left, top view; right, side view). The region r1 is colored in cyan, r2 in red, r3 in brown, and r4 in dark blue. Reaction products seen in the x-ray structure are represented as capped sticks. Glycan and peptide-binding sites are labeled. Position of some residues on the surface is indicated. **B**, same perspective as in panel **A** of ¹AmpD with the molecular surface colored as in the previous panel (left, top view; right, side view). The products of the reaction, as observed in the x-ray structure, have been superimposed for the demonstration of structural clash in the closed conformation of the NMR structure. Despite the fact that the glycan binding cavity is even larger in the NMR structure (solvent accessible volume/surface of 1009 Å³/628 Å² versus 738 Å³/394 Å² for the x-ray structure, as calculated by CASTp (54)), it could simply not accommodate the bicyclic sugar as observed in the x-ray complex. The elongated groove constituting the peptide-binding site is entirely absent in the NMR structure. **C**, details of substrate recognition by AmpD. The view shows the interactions between AmpD and the hydrolyzed substrate. The residues forming the active site are drawn as capped sticks. Carbon atoms of the ligand are in yellow, while those in the protein are color coded as in panel **A**. Salt-bridges and hydrogen bonds are shown as dashed lines.

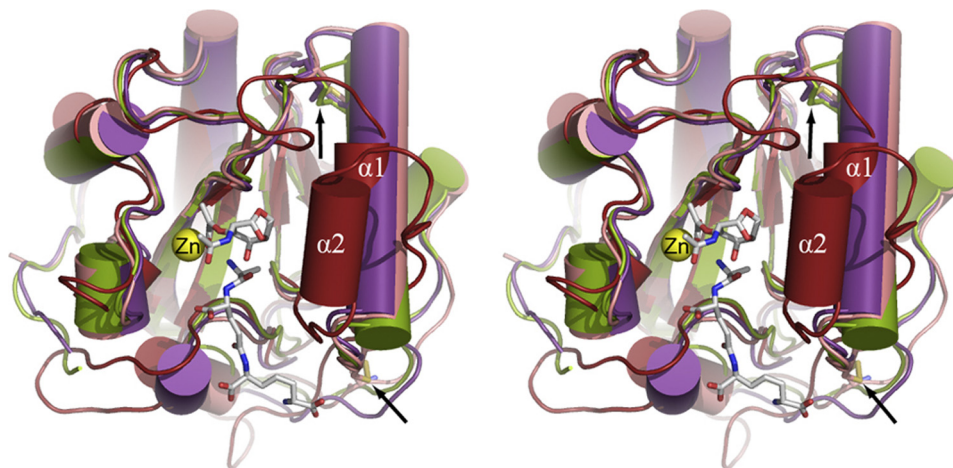


FIGURE 4. Structural comparison of AmpD and PGRPs. Superimposition of ³AmpD structure (red) and PGRPs structures (PGRP-SD in magenta, PGRP-SA in green, and PGRP-β in salmon). Reaction products **3** and **4** as seen in the AmpD complex are drawn as capped sticks. Arrows indicate disulfide bridges present in PGRP structures in the region equivalent to AmpD r2 region.

with the crystal structure (³AmpD) and that at pH 5.6 is in agreement with the reported NMR (¹AmpD) structure. These results further support the different structural results obtained by NMR and x-ray methods.

Mechanistic Implications—The difference of 0.5 pH unit for the two conditions under which the crystals were grown is

rather inconsequential. However, the structural changes that we observed argue that the protein inherently enjoys a significant propensity (low energy barrier) for conformational change within regions identified as important for transition between the two extremes of conformational states revealed by the x-ray and NMR structures. Insofar as one structure does not have a

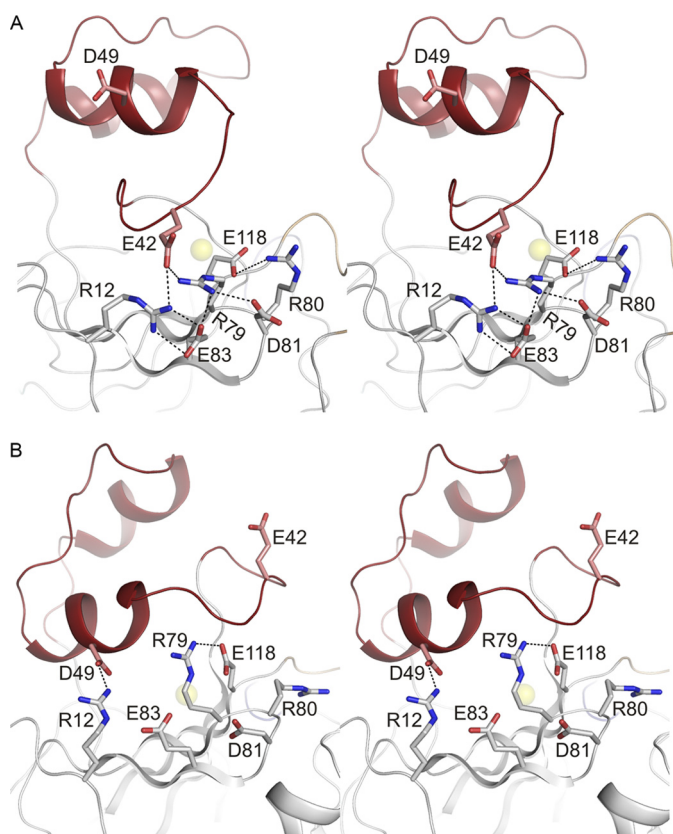


FIGURE 5. **Salt-bridge interactions network in inactive and active conformations of AmpD.** A, stereo view of the salt-bridge interactions (dashed lines) in ⁱAmpD. Region r2 is colored in red. Residues involved in the network are represented as capped sticks. B, stereo view of the salt-bridge interactions (dashed lines) in ^aAmpD. Colors are as in panel A. Glu-42 would appear to play a key role in ^aAmpD by making strong salt-bridge interactions with Arg-12 and Arg-79, creating an extended salt-bridge interaction network in this region. This network is broken in the ⁱAmpD in which the Glu-42 side chain merely extends to the solvent, while Arg-12 reinforces the active conformation by making a new salt-bridge interaction with Glu-49 that was 10 Å distant in ⁱAmpD.

functional active site and represents an inactive AmpD and the other has a fully constituted active site with demonstrated catalytic activity within the crystals, it is compelling to argue that the structural transition represents a heretofore unprecedented mechanism for activation of a zinc peptidase/proteinase. Why such an activation mechanism should be required is not known presently, but we speculate on a reason here.

The crystal structure of AmiD (42), a related peptidoglycan peptidase, lacks most of the structural regions involved in conformational change in AmpD. AmpD is cytoplasmic, whereas AmiD is periplasmic. In light of the fact that the zinc-ion environment that we have determined for ^aAmpD is exactly that seen in many disparate active zinc-dependent proteases, it is likely that this enzyme would have adventitious proteolytic activities within the cytoplasm. To shelter the cytoplasm molecules from these adventitious activities an activation mechanism would be beneficial, and might indeed be required. To regulate proteolysis, a common strategy by nature is zymogen activation that typically involves proteolytic removal of a segment of the primary structure to make available the fully constituted active site for its biological function. The zymogen-activation strategy in regulation of function of AmpD is not

TABLE 2

Effect of lipid vesicles on activity of AmpD

Buffer A is 20 mM phosphate, 1.0 mM DTT, pH 7.0. Buffer B is 40 mM bicarbonate, 1.0 mM DTT, pH 7.0.

		K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
		mM	s ⁻¹	M ⁻¹ s ⁻¹
Buffer A	Without lipids	1.0 ± 0.1	10.5 ± 0.7	(10.8 ± 0.2) × 10 ³
	Lipids (1.5 mg/ml)	1.7 ± 0.1	16.5 ± 1.0	(10.0 ± 0.2) × 10 ³
Buffer B	Without lipids	1.2 ± 0.1	6.3 ± 0.1	(5.1 ± 0.3) × 10 ³
	Lipids (1.5 mg/ml)	2.0 ± 0.3	11.9 ± 0.5	(6.0 ± 0.4) × 10 ³

seen, but the transition between the inactive and active conformations for AmpD could provide the means for such a regulatory mechanism.

The amidase_2 family includes the PGRPs that are highly conserved from insects to mammals (46–49). These enzymes can display specificities for the peptidoglycan of various bacteria and some of them have a Zn²⁺-binding site that exhibits a related amidase activity (50). Sequence analysis among amidase_2 members reveals that regions that we implicate in the activation mechanism of AmpD (especially r2) are conserved in all bacterial AmpD enzymes and in some intracellular PGRP with peptidase activity, while all related periplasmic or extracellular enzymes do not (supplemental Fig. S7).

The triggering event for transition from the inactive to active conformations for AmpD is presently unknown. While in some Zn-containing carboxypeptidases, the presence of the ligand produce a hinge-bending motion between two subdomains (51), it is likely that in AmpD there might be an allosteric mechanism for the triggering event. For example, we see a patch of positively charged amino acids on the surface of AmpD that might interact with the lipid head groups on the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. This patch concentrates most of the AmpD basic residues not involved in ligand binding. Interestingly, this cluster is part of the salt-bridge interaction network (in which the critical Glu-42 is involved) observed in ⁱAmpD. The presence of basic patches such as this has been associated with membrane sensing and binding in BAR domains, as an example (52, 53). AmpD is a soluble protein, but via this patch of amino acids it might interact with the membrane near the integral membrane permease AmpG (Fig. 1A). We have documented that the kinetic parameters are influenced in the presence or absence of lipid constituents. For example, both K_m and k_{cat} are increased in the presence of membrane vesicles made of bacterial lipid extracts (Table 2). The opportunity for multiprotein complexes, for example among AmpG, AmpD, AmpE, and NagZ, or with other proteins, have not been explored, but might serve yet as another means to the triggering of the conformational transition.

In summary, our 1.7 Å resolution x-ray structure clearly shows an open conformation for the bacterial AmpD protein that can accommodate the structures of the substrate for this enzyme. Moreover, the x-ray structure is quite distinct from the previously determined NMR folding for the same enzyme, a structure that does not have an exposed active site and could not bind the substrates. Targeted molecular dynamics also provides insight into how a transition from the inactive NMR structure to the active x-ray one could take place. This unprecedented activation mechanism for AmpD might actually be

more widely present among the intracellular members of the bacterial amidase₂ family of enzymes.

REFERENCES

- de Pedro, M. A., Donachie, W. D., Höltje, J. V., and Schwarz, H. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 4115–4126
- Park, J. T., and Uehara, T. (2008) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 211–227
- Cheng, Q., and Park, J. T. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 6434–6436
- Lee, M., Zhang, W., Heseck, D., Noll, B. C., Boggess, B., and Mobashery, S. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 8742–8743
- Jaeger, T., and Mayer, C. (2008) *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 928–939
- Wiedemann, B., Pfeifle, D., Wiegand, I., and Janas, E. (1998) *Drug Resist. Updat.* **1**, 223–226
- Schleifer, K. H., and Kandler, O. (1972) *Bacteriol. Rev.* **36**, 407–477
- Doyle, R. J., and Dziarski, R. (2001) in *Molecular Medical Microbiology* (Sussman, M., ed) pp. 137–153, Academic, London
- Cho, S., Wang, Q., Swaminathan, C. P., Heseck, D., Lee, M., Boons, G. J., Mobashery, S., and Mariuzza, R. A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 8761–8766
- Hoffmann, J. A. (2003) *Nature* **426**, 33–38
- Royet, J., and Dziarski, R. (2007) *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 264–277
- Guan, R., and Mariuzza, R. A. (2007) *Trends Microbiol.* **15**, 127–134
- Dziarski, R., Platt, K. A., Gelius, E., Steiner, H., and Gupta, D. (2003) *Blood* **102**, 689–697
- Tydel, C. C., Yuan, J., Tran, P., and Selsted, M. E. (2006) *J. Immunol.* **176**, 1154–1162
- Liepinsh, E., G  n  reux, C., Dehareng, D., Joris, B., and Otting, G. (2003) *J. Mol. Biol.* **327**, 833–842
- Heseck, D., Lee, M., Zhang, W., Noll, B. C., and Mobashery, S. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5187–5193
- Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Cryst.* **26**, 795–800
- Leslie, A. G. W. (1992) *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newslett Protein Crystallogr.*, p. 26, Daresbury Laboratory, Warrington, UK
- Evans, P. R. (1993) in *CCP4 Study Weekend* (Sawyer, L., Isaacs, N., and Bailey, S., eds) pp. 114–122, Daresbury Laboratories, Warrington, UK
- Collaborative Computational Project No 4 (1994) *Acta Crystallogr. D* **50**, 760–763
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S., and Tucker, P. A. (2005) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **61**, 449–457
- Cowtan, K. (1994) *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newslett Protein Crystallography*, p. 31, Daresbury Laboratory, Warrington, UK
- Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V. S. (1999) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 458–463
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr. A* **47**, 110–119
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. (2010) *H. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221
- Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J., and Kollman, P. (2003) *J. Comput. Chem.* **24**, 1999–2012
- Lee, M. C., and Duan, Y. (2004) *Proteins* **55**, 620–634
- Schlitter, J., Engels, M., and Kr  ger, P. (1994) *J. Mol. Graph.* **12**, 84–89
- Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., and Woods, R. J. (2005) *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–1688
- Castro, G. R. (1998) *J. Synchrotron Rad.* **5**, 657–660
- Ravel, B., and Newville, M. (2005) *J. Synchrotron Radiat.* **12**, 537–541
- Mustre de Leon, J., Rehr, J. J., Zabinsky, S. I., and Albers, R. C. (1991) *Phys. Rev. B Condens. Matter.* **44**, 4146–4156
- Holm, L., and Rosenstrom, P. (2010) *Nucleic Acids Res.* **38**, W545–W549
- Guan, R., Roychowdhury, A., Ember, B., Kumar, S., Boons, G. J., and Mariuzza, R. A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 17168–17173
- Kim, M. S., Byun, M., and Oh, B. H. (2003) *Nat. Immunol.* **4**, 787–793
- Chang, C. I., Ihara, K., Chelliah, Y., Mengin-Lecreulx, D., Wakatsuki, S., and Deisenhofer, J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 10279–10284
- Chang, C. I., Chelliah, Y., Borek, D., Mengin-Lecreulx, D., and Deisenhofer, J. (2006) *Science* **311**, 1761–1764
- G  n  reux, C., Dehareng, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Frère, J. M., and Joris, B. (2004) *Biochem. J.* **377**, 111–120
- Leone, P., Bischoff, V., Kellenberger, C., Hetru, C., Royet, J., and Roussel, A. (2008) *Mol. Immunol.* **45**, 2521–2530
- Chang, C. I., Pili-Floury, S., Hervé, M., Parquet, C., Chelliah, Y., Lemaitre, B., Mengin-Lecreulx, D., and Deisenhofer, J. (2004) *PLoS Biol.* **2**, E277
- Kerff, F., Petrella, S., Mercier, F., Sauvage, E., Herman, R., Pennartz, A., Zervosen, A., Luxen, A., Frère, J. M., Joris, B., and Charlier, P. (2010) *J. Mol. Biol.* **397**, 249–259
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., and Cygler, M. (1994) *Protein Sci.* **3**, 82–91
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A., and Thim, L. (1991) *Nature* **351**, 491–494
- Petrosino, J. F., Pendleton, A. R., Weiner, J. H., and Rosenberg, S. M. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1535–1539
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13772–13777
- Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., and Dziarski, R. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34686–34694
- Christophides, G. K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P. T., Collins, F. H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N. T., Hoffmann, J. A., Kanzok, S. M., Letunic, I., Levashina, E. A., Loukeris, T. G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L. F., Muller, H. M., Osta, M. A., Paskewitz, S. M., Reichhart, J. M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K. D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., and Kafatos, F. C. (2002) *Science* **298**, 159–165
- Dziarski, R. (2004) *Mol. Immunol.* **40**, 877–886
- Wang, M., Liu, L. H., Wang, S., Li, X., Lu, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2007) *J. Immunol.* **178**, 3116–3125
- Towler, P., Staker, B., Prasad, S. G., Menon, S., Tang, J., Parsons, T., Ryan, D., Fisher, M., Williams, D., Dales, N. A., Patane, M. A., and Pantoliano, M. W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 17996–18007
- Zhu, G., Chen, J., Liu, J., Brunzelle, J. S., Huang, B., Wakeham, N., Terzyan, S., Li, X., Rao, Z., Li, G., and Zhang, X. C. (2007) *EMBO J.* **26**, 3484–3493
- Reider, A., Barker, S. L., Mishra, S. K., Im, Y. J., Maldonado-Báez, L., Hurley, J. H., Traub, L. M., and Wendland, B. (2009) *EMBO J.* **28**, 3103–3116
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., and Liang, J. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**, W116–118

Supplemental Material

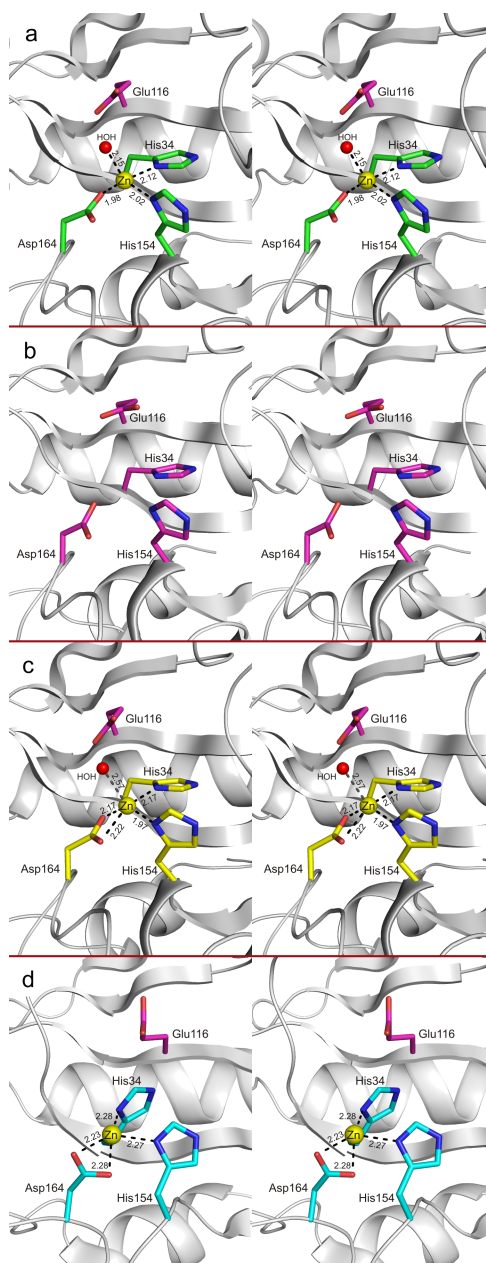


Fig. S1. Stereo views showing coordination of the catalytic Zn cation. (a) Active AmpD holoenzyme at pH 6.0; (b) AmpD apoenzyme at pH 6.0; (c) crystal structure of AmpD at pH 5.5; and (d) NMR structure of AmpD at pH 5.5. A tetrahedral coordination of zinc is observed in ¹AmpD by His34 (2.28 Å), His154 (2.27 Å) and Asp164 (bifurcated, 2.23 Å and 2.28 Å), whereas coordination of the zinc ion in ^aAmpD (panel A) is by His34 and His154 (2.12 Å and 2.02 Å, respectively), Asp164 (1.98 Å) and a water molecule (2.15 Å).

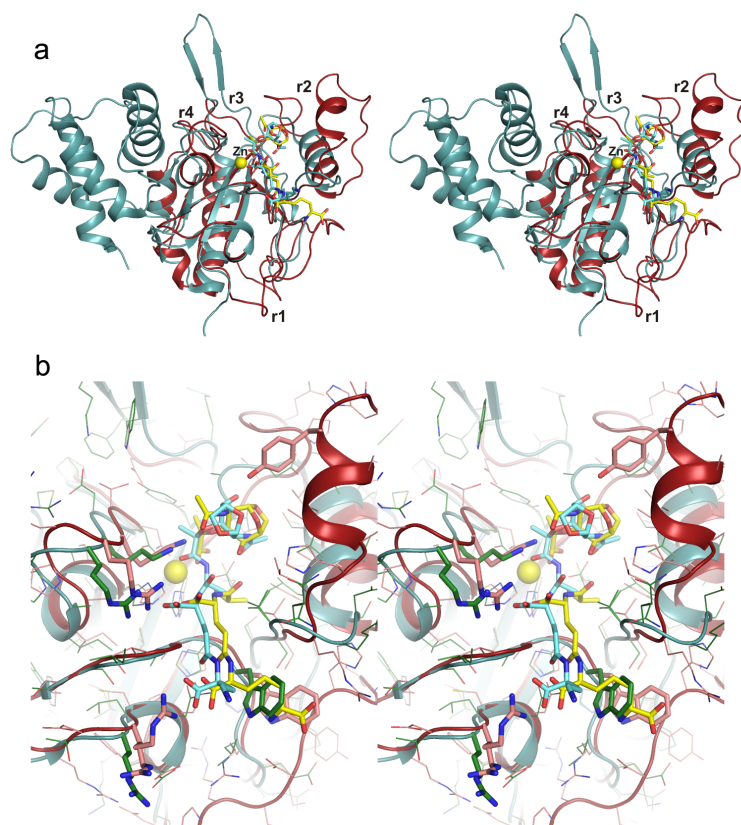


Fig. S2. Superimposition of AmpD and AmiD complexes. (a) Stereo view of the ^aAmpD (red) and its substrate (yellow sticks) superimposed with AmiD (blue) and its substrate (cyan sticks). Regions r1-r4 of AmpD are labelled. (b) Stereo view of the residues stabilizing substrate in ^aAmpD (red) and AmiD (blue). Colors are as in panel a. Residues involved in ligand binding from r4 region are strictly conserved in both enzymes. The wider ligand-binding site observed in AmiD is perhaps consistent with its hydrolytic activity on the peptidoglycan, a polymer, whereas AmpD has specialized for turnover of a smaller substrate, compound **2**.

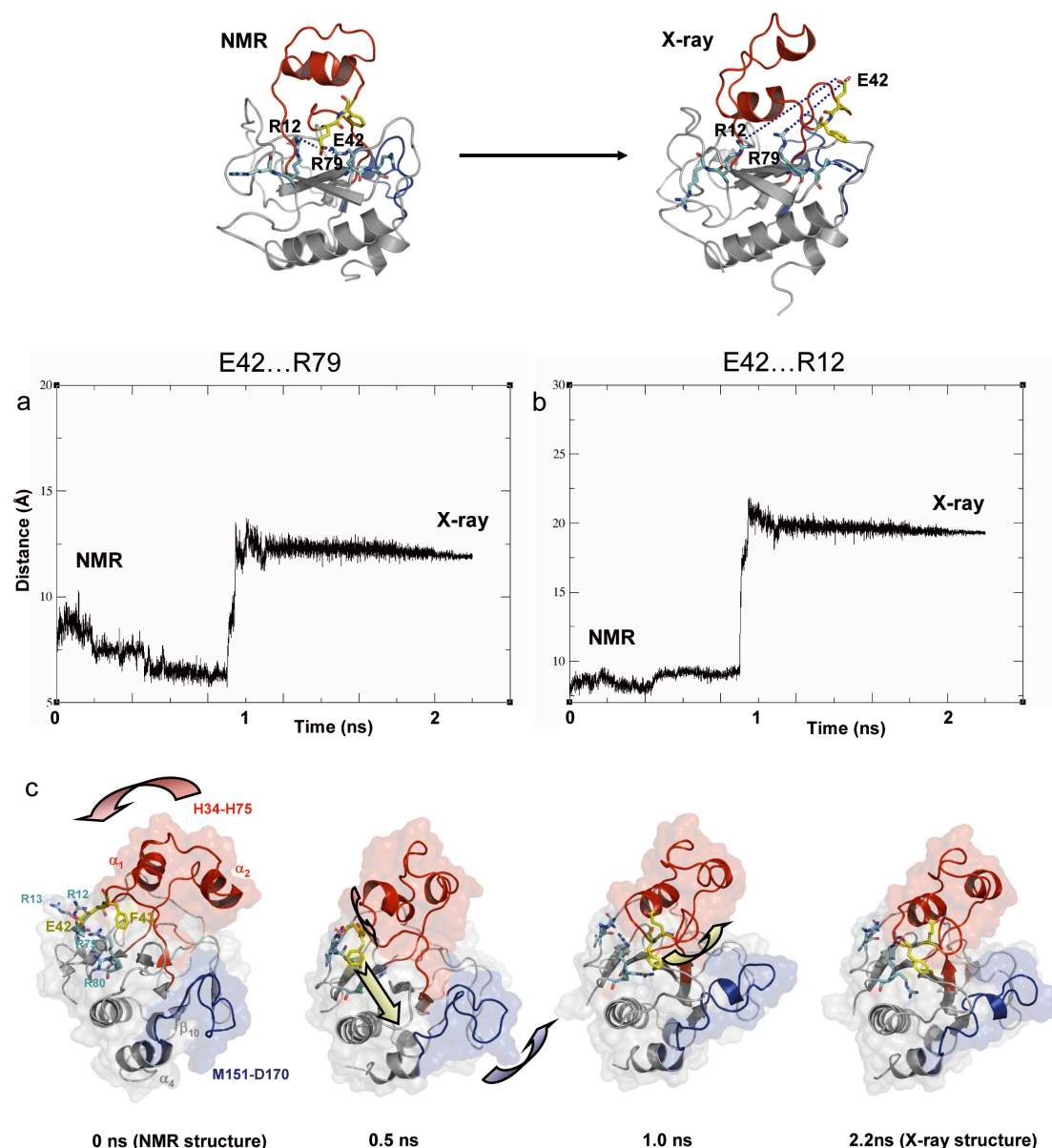


Fig. S3. Conformational changes observed during TMD simulation of AmpD, going from the NMR (closed state) to the X-ray (open state) structure. Distance variation as a function of simulation time between the center of mass of (a) E42...R79 and (b) E42...R12. (c) Snapshots taken along the TMD simulation showing the sequence of conformational events. Within the first 0.5 ns, drastic local rearrangements of α_1 and α_2 helices from the r2 (H34-H75) region are observed, accompanied by conformational changes within the r4 (M151-D170) region, corresponding to the loop comprised of β_{10} and α_4 helix. The hinge motion of r2 region involves a rapid swing of both α_1 and α_2 helices, which then induce conformational rearrangements of the adjacent PPGEFGGP loop, in particular a displacement of the hydrophobic F43 residue that becomes more exposed to the solvent environment (0.5 ns). F43 appears to play a key role during the conformational transition (~1 ns) by pulling away E42 out of the tight R12-E42-R79 salt-bridge network. As shown by the sharp increase in distances E42...R79 and E42...R12 (a, b), the E42 side chain is displaced very rapidly (around 1.0 ns of the simulation) toward its

crystallographic position after breaking first the ionic interaction with R12 guanidinium, then dissociating from the R79 side chain, while transiently interacting with R80.

The transition to the “open” active conformer was achieved within the first half of the simulation period. Dramatic local rearrangements of the two helices within the r2 region are accompanied by significant conformational changes within the r4 region (Movie S2A). The hinge motion of r2 region involves a swing of both α -helices that move away from the catalytic Zn ion. Tyr63, sequestered in a pocket near the zinc ion in ⁱAmpD (the hydroxyl group of Tyr63 is 6.0 Å from the Zn cation, Movie S2A), moves as much as 16 Å away from the zinc, and finally settles at 11.0 Å from it on formation of the active site in ^aAmpD. The movement of α -helix containing Tyr63 also induces conformational rearrangements of the adjacent ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ loop, in particular a displacement of Phe43, which becomes more exposed to the milieu. In this process, Phe43 exhibits considerable flexibility compared to the rest of the protein, also documented by a high crystallographic B-factor. This residue appears to play a key role during the conformational transition (within ~1 ns) by retracting Glu42 out of the aforementioned salt-bridge interaction with Arg12 and Arg79, as seen in the NMR structure and thus disrupting it (Movie S2B).

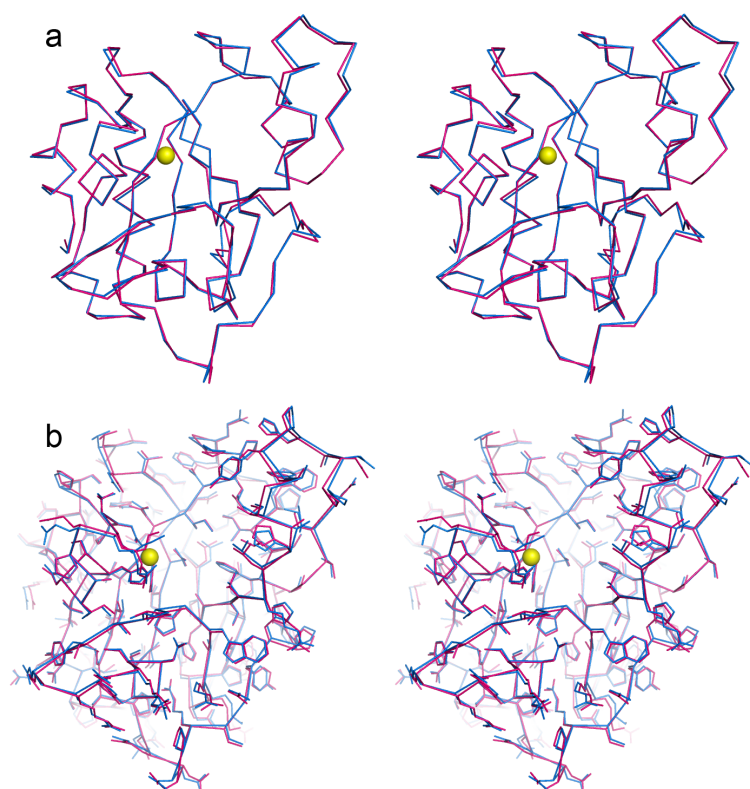


Fig. S4. AmpD crystal structures at pH 6.0 and pH 5.5. (a) Stereo view showing backbone superimposition of the crystal structure of AmpD at pH 6.0 (blue) and at pH 5.5 (magenta). (b) Stereo view showing the same superimposition than in panel (a) with side chains included.

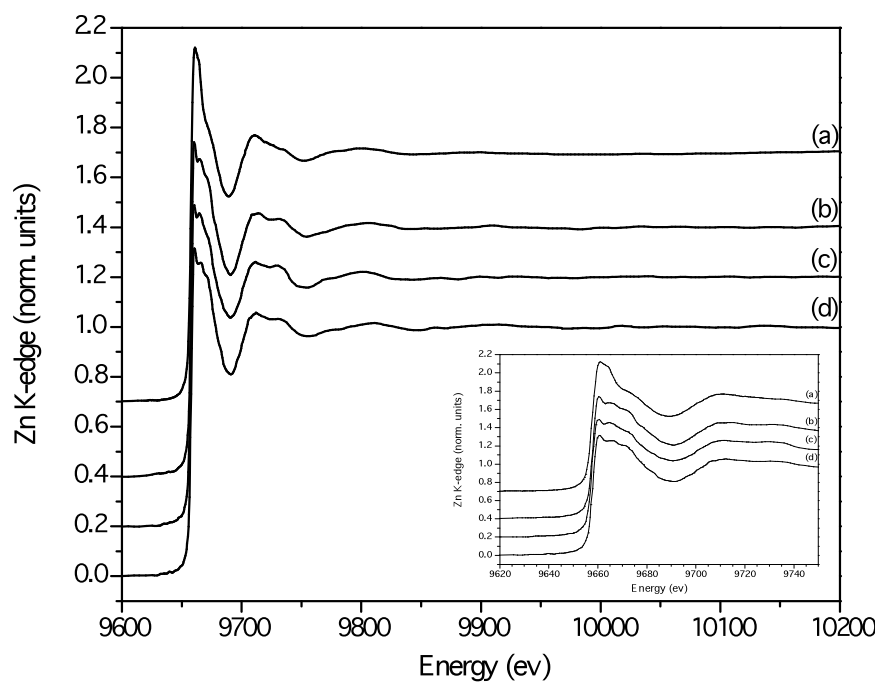


Fig. S5. Zn K-edge absorption spectra of crystalline AmpD suspended at pH 6 (a) and pH 5.6 (b), 7 (c) and 8.2 (d) AmpD solutions. XANES spectra region detailed (inset). In the X-ray absorption near edge structure (XANES) region (inset the Figure), clear differences are observed between different samples. These differences reflect a change in the structure around the Zn atoms. A difference is also observed between the liquid solutions as a consequence of the pH.

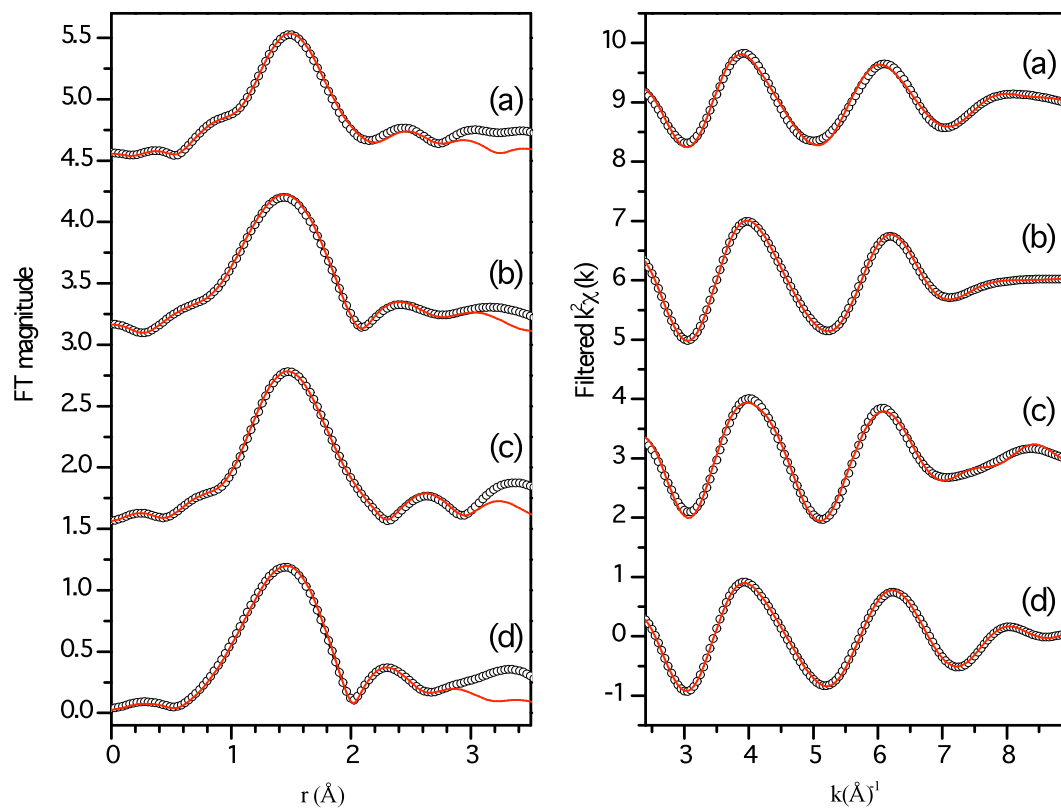


Fig. S6. Fourier transformations from the EXAFS signal (not corrected for phase shift) (left) and filtered (see experimental procedure). EXAFS signal (right) from crystalline sample suspended at pH 6 (a) and AmpD solutions at pH 5.6 (b), 7.0 (c) and 8.2 (d) (black circle lines) and best fits (red solid lines).



Fig. S7. (a) Sequence comparison among amidase₂ family members. **(a)** Alignment of bacterial cytosolic N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from the amidase₂ family. Accession codes (from NCBI or UniProt databases) for each protein and their species are indicated in the figure. Red box highlights the AmpD sequence from *Citrobacter freundii*. Conserved residues are colored (color code is indicated inside the gray box). The conserved sequence ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ is highlighted by a black box. Empty spaces inside the sequences represent gaps. **(b)** Alignment of the sequence of AmpD from *Citrobacter freundii* (UniProt: P82974) with that of AmiD from *Escherichia coli* (UniProt: P75820). Conserved residues are colored as in panel a. Black box highlights the sequence ³⁹PPGEFGGP⁴⁶. Despite AmiD belongs to the same amidase₂ family, this periplasmic membrane-anchored enzyme does not have the r2 region (therefore the ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ loop is not conserved). **(c)** Alignment of AmpD from *Citrobacter freundii* (UniProt: P82974) and AmiE from *Staphylococcus epidermidis* (UniProt: O33635). The sequence ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ (black box highlights), as in AmiD, this

sequence is not conserved in periplasmic AmiE. Alignments were performed using the Jalview program (1).

Movie legends

Movie S1. Structural changes from NMR AmpD structure to X-ray AmpD structure.

C-alpha backbone is colored in orange. Side chains are represented as capped sticks, with atoms colored by atom types (nitrogen, blue; oxygen, red, and carbon, white).

Movie S2A. Overall transition from the inactive AmpD conformer to the active conformer, as deduced by TMD simulations.

The region r1 is colored in cyan, r2 in red, r3 in brown and r4 in dark blue. Distances between Tyr63 and Zn cation (dashed line) and their values during activation are indicated. Glu42 and Phe43 residues from ³⁹PPGEFGGP⁴⁶ loop are drawn as pink sticks and products are drawn as yellow sticks.

Movie S2B: Evolution of the salt-bridge interactions network during AmpD activation, as deduced by TMD simulations.

The region r1 is colored in cyan, r2 in red, r3 in brown and r4 in dark blue. All residues involved in the network and Phe43 are represented as capped sticks. Zn cation is drawn as a yellow sphere. Salt-bridge interactions are indicated as dashed lines.

Table S1. Point mutations that influence activity in AmpD from enterobacteria (2) and the structural context. Location of these mutants on the three-dimensional structure of ^aAmpD is depicted below (Stereo view).

Residue	Protein Region	change from closed to open conformation? (rmsd for C α and side chains)	Structural Explanation
Trp7	-	Yes (3.83; 2.7 Å)	Structural stabilization of hairpin β_1 - β_2
Val33	-	No	Protein core
Ser37	r2	Yes (3.9; 6.1 Å)	Mutation will block movement of ³⁹ PPGEFGGP ⁴⁶ loop
Arg80	-	Yes (2.1; 7.0 Å)	Mutation will block salt bridge network in open conformation
Gly82	-	No	Mutation will block salt bridge network
Glu83	-	Yes (1.9; 4.0 Å)	Mutation will block salt bridge network
Ala94	-	No	Mutation will block stabilization of peptide stem
Trp95	-	Yes (1.9; 7.6 Å)	Mutation will block stabilization of peptide stem
Tyr102	-	Yes (2.7; 4.8 Å)	Mutation will block movement of r4 region
Leu117	-	No	Protein core
Asp121	r3	Yes (7.7; 10.0 Å)	Mutation will block movement of r2 region
Asp127	-	No	Involved in salt bridge with Arg173
Ala134	-	No	Protein core
Ala146	-	No	Protein core
Ala158	r4	Yes (8.6; 9.3 Å)	Mutation will block substrate stabilization by residues Arg161 and Lys162
Asp164	r4	No	Involved Zn coordination
Trp171	-	No	Stabilization of r4 region
Ala172	-	No	Mutation will block salt-bridge of Arg173 and stabilization of r4 region by Trp171

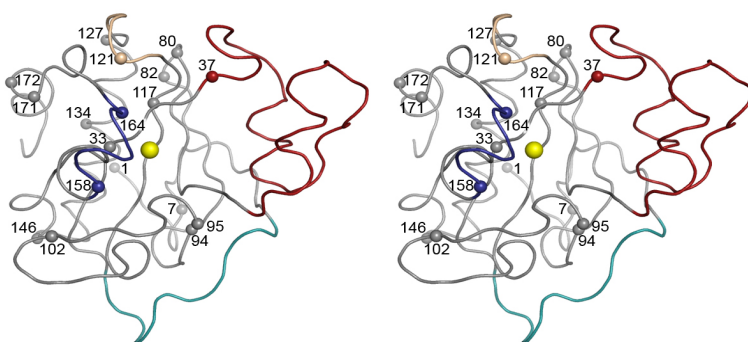


Table S2. Structural parameters obtained from EXAFS fits from AmpD protein spectra measured under different experimental conditions: crystalline sample on solution at pH 6 and AmpD solutions at pH 5.6, 7 and 8.2. Mean-square displacement (σ^2) is $0.004 \pm 0.001 \text{ \AA}^2$. Interatomic distances (\AA) compatible with Zn coordination are indicated in bold. χ^2 is the reduced chi-square and R-factor is described as: $\Sigma((\text{data-fit})^2)/(\Sigma(\text{data})^2)$.

AmpD		Carboxyl group			H ₂ O/OH ⁻ group		I - Histidine group			II - Histidine group			χ^2	R factor
State	pH	Zn-O1	Zn-O2	Zn-C1	Zn-O3	Zn-O4	Zn-N1	Zn-C2	Zn-C3	Zn-N2	Zn-C4	Zn-C5		
crystal	6	1.89	2.49	2.52	2.02	-	2.00	3.04	3.45	2.00	3.20	3.50	38.1	0.009
liquid	5.6	2.00	1.99	2.50	-	-	2.04	2.88	3.16	2.08	3.34	2.99	17.0	0.002
liquid	7.0	1.95	2.54	2.69	1.95	1.95	2.09	3.05	3.04	2.21	3.05	3.53	20.7	0.004
liquid	8.2	1.94	2.45	2.69	1.94	1.94	2.07	2.96	3.25	2.24	2.93	3.19	15.3	0.003

The structural parameters obtained from the fits are showed. For the crystalline sample at pH 6, the fit shows four atoms in the first coordination shell around the zinc, corresponding to two nitrogen atoms (N1-N2) and an oxygen (O1) from a carboxyl group and an oxygen (O3) from a water molecule. Furthermore, the two atoms around 2.5 \AA present in the structure are related with the carbon (C1) and the oxygen (O2) from the carboxyl group, so this group is bound to the zinc by one oxygen (O1). The obtained local structure around the zinc is in good agreement with the ^aAmpD X-Ray structure.

At pH 5.6, four atoms are seen in the first coordination shell ($\sim 2 \text{ \AA}$) corresponding to two oxygen atoms (O1-O2) from the carboxyl group and two nitrogen (N1-N2) from two histidine ligands and one carbon (C1) from carboxyl group at around 2.5 \AA . The principal difference of the protein structure at pH 5.6 relative to the crystalline AmpD at pH 6 consists of the lack of a water molecule (O3). In addition, a distortion in the bonding of the carboxyl group is observed. The carboxyl group is bound to the zinc atom by two oxygens (O1-O2) and the distance of the bond between the oxygen (O2) and zinc is reduced. The structure at pH 5.6 is in good agreement with the structure reported by NMR.

Samples in the solutions at pH 7 and 8.2 present differences in Zn coordination structures compared with the ones obtained at pH 6.0 and 5.6. The local zinc structure is described by four atoms at about 2 \AA and one at about 2.2 \AA . The first coordination corresponds to one nitrogen (N1) from one histidine amino acid, an oxygen (O1) from the carboxyl group and two oxygens (O3-O4) from a water molecule and OH⁻ ligand, while the second shell presents a nitrogen (N2) from a second histidine ligand. The results indicate that the oxygen (O1-O2) atoms from the carboxyl group keep the same structure as is seen in the crystalline protein suspended in pH 6 solution. On the other hand, the bonding distance of the nitrogen (N2) from histidine to the zinc ion has increased to 2.2 \AA , making room for an additional water/OH⁻ molecule (O4).

Therefore, for crystalline AmpD suspended in pH 6 mother solution and protein solutions at pH 5.6, 7 and 8.2, the changes in the local protein structure around Zn ion are significant and the results indicate the existence of three different zinc local structures as a function of the pH. The structures at 7 and 8.2 are similar and close to that of the active AmpD X-ray structure (pH 6.0), while Zn coordination at pH 5.6 is in agreement with the reported NMR (ⁱAmpD).

References

1. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009) *Bioinformatics* **25**, 1189-1191.
2. Petrosino, J.F., Pendleton, A.R., Weiner, J.H., and Rosenberg, S.M. (2002) *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1535-1539.